

**Evaluierung des spezifischen Targetings von
EBV und EBV-miRNA zur Entwicklung
einer neuen *gene-silencing*-basierten
Therapiestrategie**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. Biologin Anita Hartung

geboren am 27.08.1987 in Arnstadt

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Mathias Pletz, Universitätsklinikum Jena, Institut für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene
2. apl. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Henke, Universitätsklinikum Jena, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Sektion Experimentelle Virologie
3. Prof. Dr. med. Jörg Hofmann, Charité Berlin, Institut für Virologie

Tag der Verteidigung: 17.03.2020

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
1. Einleitung.....	5
1.1. Das Epstein-Barr-Virus	5
1.1.1. Lebenszyklus und Pathogenese	5
1.1.2. EBV-assoziierte Erkrankungen	6
1.1.3. Therapiemöglichkeiten.....	7
1.2. MicroRNAs	8
1.2.1. Synthese der miRNAs	8
1.2.2. Regulation der Genexpression durch miRNAs	10
1.2.3. Vorkommen und Verbreitung im menschlichen Organismus	10
1.2.4. Nachweismethoden von microRNAs	11
1.3. EBV –assoziierte microRNAs	12
1.3.1. Expressionsmuster	13
1.3.2. Regulation der Immunantwort und Tumorgenese.....	14
1.4. Regulatorische RNAs als Therapiemöglichkeit.....	16
1.5. Ziele der Arbeit	17
2. Material	19
2.1. Zelllinien	19
2.2. Verwendete Kits.....	19
2.3. Reagenzien für PCR.....	19
2.4. Oligonukleotide	20
2.5. Puffer und Lösungen	22
2.6. Sonstige Materialien	23
2.7. Geräte.....	23
2.8. Computerprogramme.....	24
3. Methoden.....	25
3.1. RNA-Isolation	25
3.1.1. Aufreinigung von Total-RNA mit der Säulenmethode	25

3.1.2.	Aufreinigung mit der Phenol/Chloroform-Methode.....	25
3.1.3.	Aufreinigung von miRNA	25
3.2.	Reverse Transkription.....	26
3.2.1.	RT mit geloopten Primern	26
3.2.2.	Poly(A)-RT	27
3.2.3.	Transkription von mRNA.....	27
3.3.	Präamplifikation	27
3.4.	SYBR® Green-PCR	28
3.4.1.	Studienanalyse	28
3.4.2.	Auswertung der Transfektion	28
3.5.	Taqman-PCR.....	29
3.6.	miScript-PCR.....	30
3.7.	Studienanalyse	30
3.7.1.	Probenasservierung und Analyse	30
3.7.2.	Ermittlung der Standardkurven	31
3.7.3.	Relative Quantifizierung.....	31
3.7.4.	Absolute Quantifizierung.....	32
3.8.	Statistische Analysen.....	33
3.9.	Acrylamidgele	33
3.10.	Transfektion	33
4.	Sudiensynopse	34
5.	Ergebnisse.....	35
5.1.	Studienkohorte	35
5.1.1.	Probeneinschluss	35
5.1.2.	Allgemeine Daten	36
5.2.	Etablierung einer geeigneten PCR-basierten Nachweismethode	38
5.2.1.	Evaluierung einer effizienten Isolationsmethode für miRNA aus Vollblut....	38
5.2.2.	Validierung der qPCR mit Taqman-Sonden.....	38
5.2.3.	Validierung des Poly(A)-RT qPCR-Systems	40
5.2.4.	Kombination von Loop-RT und SYBR® Green-PCR	40
5.2.5.	Verwendung einer Präamplifikation zur Signalverstärkung.....	42

5.3. Quantifizierung der miRNA aus Patientenproben	44
5.4. <i>Gene silencing</i> mittels siRNA	52
6. Diskussion	55
6.1. Probenakquise und Repräsentativität der Kohorte	55
6.2. Herausforderungen und Stolpersteine beim Quantifizieren der miRNA	56
6.2.1. Poly(A)-PCR	56
6.2.2. Loop-PCR	57
6.2.3. Loop-SYBR Green PCR	59
6.3. Differenziale Expression der EBV miRNAs während der verschiedenen Infektionsphasen	60
6.3.1. Erstinfektionen	61
6.3.2. Reaktivierungen	62
6.3.3. Identifizierung der Infektionsphase	63
6.4. Zielgerichtete Regulation von EBV-infizierten Zellen	65
7. Schlussfolgerungen	68
8. Quellen	70
9. Anhang	77
9.1. Zusammenfassung der Studienrohdaten	77
9.2. Transfektionsdaten	83
9.3. Ethikantrag	84
9.4. Chronologischer Verlauf der Studie	87
9.5. Patientenaufklärung	88
9.6. Dokumentationsbogen	91
9.7. Abbildungsverzeichnis	92
9.8. Tabellenverzeichnis	94
9.9. Danksagung	95
9.10. Lebenslauf	96
9.11. Ehrenwörtliche Erklärung	98

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AGAP	<u>A</u> rfGAP mit <u>G</u> TPase-Domäne, <u>A</u> nkyrin Wiederholung und <u>P</u> H- Domäne
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
BamH I	<u>B</u> acillus <u>a</u> myloli <u>q</u> uefaciens <u>H</u> Restriktionsenzym <u>I</u>
BART	<u>B</u> amH I <u>A</u> region <u>R</u> ightward <u>T</u> ranscript
BHRF1	<u>B</u> amH I fragment <u>H</u> <u>R</u> ightward open reading <u>F</u> rame 1
bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
C	Cytosin
cDNA	Komplementäre DNA
C _T	Treshhold cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRKS	Deutsches Register Klinischer Studien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GAPDH	<u>G</u> lycerinal <u>a</u> ldehyd-3-phosphat- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLH	<u>H</u> ämophagozytische <u>L</u> ymphoh <u>i</u> stiozytose
IM	Infektiöse Mononukleose
kb	Kilobasen
LCL	<u>L</u> ymphoblastoid <u>C</u> ell <u>L</u> ine
miRNA	microRNA
mRNA	Messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPC	Nasopharynxkarzinom (<u>N</u> asopharygeal <u>c</u> arcinoma)
NRT	<u>N</u> o <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription
nt	Nukleotide
NTC	Wasserkontrolle (<u>N</u> o <u>T</u> emplate <u>C</u> ontrol)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PTLD	<u>P</u> ost- <u>T</u> ransplant <u>L</u> ymphoproliferative <u>D</u> isorder
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<u>R</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute)
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskription
siRNA	Small interfering RNA
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
u	Uracil
U/μl	Units pro Mikroliter
UTR	Nichttranslatierte Region (<u>u</u> n <u>t</u> ranslated <u>r</u> egion)
VF	Verdünnungsfaktor

Zusammenfassung

Das humanpathogene Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zu den Herpesviren und ist mit einer Durchseuchungsrate von ca. 95% bei Erwachsenen das am häufigsten verbreitete Virus weltweit. Nach Erstinfektion persistiert das Virus lebenslang im Wirt und reaktiviert unter bestimmten Umständen (z.B. Immunsuppression, Stress). Infektionen und Reaktivierungen verlaufen meist symptomlos oder als leichter grippaler Infekt. EBV kann aber auch schwerwiegende Erkrankungen, wie die Hämophagozytische Lymphohistiozytose, die Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung oder maligne Erkrankungen auslösen. In Gegensatz zu anderen Herpesviren gibt es keine klinisch geprüfte EBV-wirksame Therapie. Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor von EBV sind microRNAs (kurz miRNAs). Diese kleinen RNAs greifen in die Regulation der Proliferation, Apoptose oder Reifung von Immunzellen ein. Die miRNAs stehen deshalb als Marker für die unterschiedlichen EBV-induzierten Tumore im Fokus der EBV-Forschung, die Expressionsprofile während einer Erstinfektion, der Persistenz oder Reaktivierung wurden hingegen kaum untersucht.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Studie mit 122 Probanden eine Nachweismethode für verschiedene EBV-miRNAs etabliert und die Expression in verschiedenen Infektionsphasen analysiert. Dafür wurden zunächst verschiedene quantitative PCR-Methoden validiert und schließlich eine Kombination aus einem Loop-Primer und SYBR-Green verwendet. Ferner wurde eine Normalisierung zu einer Kontrollgruppe aus EBV-seronegativen Patienten vorgenommen, um die Fehlerrate durch falsch-positive Signale zu reduzieren. So konnte gezeigt werden, dass die miR-BHRF1-1 während der Erstinfektion besonders stark exprimiert wird und sich damit als molekularer Marker für diese Phase eignen würde. Für die Reaktivierungen hingegen konnte keine spezifische miRNA ermittelt werden, da die Expressionslevel der miRNAs sehr gering und vergleichbar mit denen in der symptomfreien Persistenz waren.

Da Infektionsphasen-spezifische miRNA potentielle Ansatzpunkte für eine neuartige EBV-Therapie sind, wurden auch Experimente zum ‚*gene silencing*‘ mit zielgerichteten siRNAs in EBV-immortalisierten B-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde sogenannte „intelligente“ siRNA verwendet, die durch die Kopplung eines Peptides nur in Zellen aktiviert werden kann, welche eine bestimmte Virus-spezifische Protease produzieren. In den Vorversuchen mit einer gegen humane AGAP1-mRNA gerichteten siRNA konnte jedoch kein ‚*gene silencing*‘ erzielt werden, da das Peptid nicht abgespalten und somit die

transfizierte siRNA nicht aktiviert wurde. Die Ursache für die verminderte Aktivität der EBV-Protease gegen das Peptid der siRNA wurde nicht identifiziert. Ein selektives *gene silencing* auf Basis der EBV-kodierten Protease scheint somit kein erfolgversprechender Ansatz.

1. Einleitung

1.1. Das Epstein-Barr-Virus

Das zu den Gammaherpesviren zählende Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zu den erfolgreichsten Viren weltweit, denn bis zum Erwachsenenalter sind über 90 % der Bevölkerung serokonvertiert (seropositiv für EBV). Nach dem Erstkontakt mit dem Virus dringt es in die B-Zellen ein, entgeht somit einer Immunantwort und persistiert dort lebenslang (Nowalk and Green 2016).

1.1.1. Lebenszyklus und Pathogenese

Die Übertragung von EBV erfolgt am häufigsten über Tröpfcheninfektionen bzw. Speichelkontakt (Nowalk and Green 2016). Über den Rachenraum dringen die Viruspartikel in die lokalen Lymphknoten ein und können die dort befindlichen naiven B-Zellen infizieren (Faulkner, Krajewski et al. 2000). In diesen werden 9 virale Latenzproteine exprimiert (auch als Latenz III bezeichnet), die eine Proliferation und Reifung der naiven B-Zelle auslösen. Nach Ausdifferenzierung zu B-Gedächtniszellen wird die Expression der viralen Proteine vollständig herunterreguliert (Hochberg, Souza et al. 2004). Das Virus tritt damit in die Latenz I bzw. 0 ein (Forte and Luftig 2011, Lo, Dawson et al. 2012). Diese ruhenden B-Gedächtniszellen zirkulieren im Blut und können durch die fehlende Expression viraler Proteine nicht vom Immunsystem erkannt werden. Durch Anreicherung infizierter Zellen können schließlich bis zu 50 % der B-Gedächtniszellen mit EBV infiziert sein (Hochberg, Souza et al. 2004). Über den Blutstrom passieren diese Zellen erneut die Lymphknoten, wo sich dann ein kleiner Teil zu Plasmazellen differenziert, in denen das Virus wieder in die lytische Phase übergeht. Ein Teil der neu-produzierten Viruspartikel infiziert nun neue B-Zellen. Der Rest geht in den Speichel über und kann von hier aus auf Andere übertragen werden (Hochberg, Souza et al. 2004).

So hat eine Studie von 2016 gezeigt, dass auch gesunde Menschen EBV-Viruspartikel im Speichel tragen können. Gesunden Trägern wurden über 6 Monate immer wieder Speichelproben entnommen und auf EBV untersucht. 39 % aller Proben waren positiv für EBV; bei den unter 30 Jährigen sogar 53 % (Johnson, Webb et al. 2016). Es konnte also nachgewiesen werden, dass EBV von einem Großteil der Menschen häufig reaktiviert wird und somit nicht-EBV-Infizierte einer ständigen Ansteckungsgefahr ausgesetzt sind.

Die Erstinfektion mit EBV verläuft meist symptomlos oder mit unspezifischen Erkältungssymptomen (Nowalk and Green 2016). Die Schwere der Erkrankung hängt dabei oft vom Alter des Patienten ab. Während sich in den Entwicklungsländern die meisten Kinder bis 5 Jahre symptomlos infizieren, findet die Erstinfektion in den Industrieländern meist im späteren Jugendalter statt und geht in 25 % der Fälle mit der Symptomatik einer Infektiösen Mononukleose (IM) einher (Rickinson 2007).

Was die Ursache für die unterschiedlichen Phänotypen der Infektion ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Bei immunsupprimierten Patienten scheint es eine Korrelation zwischen Schwere der Symptome und Viruslast zu geben (Nowalk and Green 2016). Bei einer mit IM einhergehenden Erstinfektion sind zwar relativ hohe Viruslasten nachweisbar, allerdings zeigte eine neuere Studie, dass auch bei asymptomatischen Verläufen in Kleinkindern vergleichbare Viruslasten auftraten (Jayasooriya, de Silva et al. 2015). Denkbar wäre, dass EBV außer B-Zellen auch andere Zellen infiziert, wie z.B. T- oder NK-Zellen, was zu einer schwereren Infektion führen könnte. So sind im asiatischen Raum viele chronisch aktive EBV-Infektionen mit T- oder NK-Zellen assoziiert (Cho, Kim et al. 2008, Kawano, Iwata et al. 2013). In einer neueren Studie wurden erstmalig Probanden während der Inkubationszeit bis zum Beginn der IM untersucht (Dunmire, Grimm et al. 2015). Der analysierte Zeitraum betrug 6 Wochen vor Auftreten der ersten Symptome. Dabei konnte gezeigt werden, dass die T-Zell-Antwort erst kurz vor Symptombeginn erhöht war. Die NK-Zell-Antwort sogar erst nach den ersten Symptomen. Zudem konnte keine EBV-DNA bis 3 Wochen vor Symptombeginn im Blut bzw. bis 1 Woche vorher im Speichel nachgewiesen werden. Eine eindeutige Erklärung für die unterschiedliche Schwere von EBV-Erstinfektionen gibt es also noch nicht. Jayasooriya *et al.* zeigten jedoch, dass bei asymptomatischen Infektionen die CD8⁺ T-Zellen zwar erhöht sind, aber keine überschießende T-Zellantwort wie sie bei einer IM auftritt. Sie schlussfolgern daraus, dass bei einer IM nicht EBV selbst, sondern die fehlregulierte Immunantwort die Symptome hervorruft (Jayasooriya, de Silva et al. 2015).

1.1.2. EBV-assoziierte Erkrankungen

Entdeckt wurde das Epstein-Barr-Virus im Jahr 1964 in Biopsiematerial des Burkitt-Lymphoms (Epstein, Achong et al. 1964). Heute weiß man, dass es der Auslöser einer Vielzahl von Erkrankungen sein kann. Eine der wichtigsten Komplikationen ist die bereits erwähnte Infektiöse Mononukleose, charakterisiert durch Pharyngitis,

Lymphknotenschwellungen, Fieber, Mattheit und einer hohen Zahl von anti-EBV-gerichteten CD8⁺-T-Zellen (Balfour, Dunmire et al. 2015).

In einigen Fällen kann es zur Ausprägung der seltenen aber sehr fatalen Hämophagozytischen Lymphohistiozytose (HLH) kommen. Diese ist durch eine übermäßige Aktivierung des Immunsystems charakterisiert. Durch ein Überschuss an Zytokinen kommt es letztendlich dazu, dass überaktivierte Makrophagen die eigenen Leukozyten und Erythrozyten phagozytieren (Janka 2007). Die Diagnose einer HLH ist schwierig, weil sie sich in unspezifischen Symptomen äußert. Daher wird sie meist zu spät erkannt und endet oftmals in einem letalen Multiorganversagen (Fisman 2000, Henter, Horne et al. 2007).

Die EBV-induzierte Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) ist die wichtigste EBV-assoziierte Komplikation nach Transplantationen (Nowalk and Green 2016). Dabei kommt es nach einer Organ- oder Stammzellentransplantation zu einer unkontrollierten Vermehrung von EBV-infizierten Lymphozyten (Taylor, Marcus et al. 2005, Nowalk and Green 2016). Am häufigsten tritt die PTLD bei Kindern auf, da diese oft noch seronegativ für EBV sind, aber durch die hohe Durchseuchungsrate meist EBV-infiziertes Material übertragen bekommen (Nowalk and Green 2016).

Die Erkrankungen mit der wahrscheinlich höchsten Krankheitslast stellen die EBV-assoziierten Tumore dar. Diese sind Inhalt einer Großzahl an Publikationen und damit der wesentliche Schwerpunkt der EBV-Forschung. Zu den häufigsten zählen vor allem das Burkitt-Lymphom, das Hodgkin-Lymphom und das Nasopharyngialkarzinom (Faulkner, Krajewski et al. 2000). EBV konnte aber auch schon als Auslöser für Magenkarzinome (Tsai, Liu et al. 2016), andere B-Zell-Lymphome (Faulkner, Krajewski et al. 2000) und das T/NK-Zellassozierte Non-Hodgkin-Lymphom (Cho, Kim et al. 2008) identifiziert werden.

1.1.3. Therapiemöglichkeiten

Bis heute gibt es kein Mittel, um EBV-Infektionen effektiv zu behandeln oder vorzubeugen. Da die Erstinfektion klinisch meist selbstlimitierend ist, wird nur symptomatisch behandelt (Ebell 2004). Der Einsatz von antiviralen Mitteln, wie Aciclovir ist umstritten (Kenney 2007), da die Virostatika nur auf sich aktiv replizierende Viren wirken. EBV-infizierte Zellen sind jedoch fast ausschließlich ruhend (Hochberg, Souza et al. 2004). Es findet also keine Proliferation statt und das Virus verharrt in der Latenzphase. Auch bei einer akuten IM mit hohen Viruslasten findet man EBV zumeist in ruhenden B-Gedächtniszellen. Nur ein sehr geringer Anteil geht in die Lyse über und produziert Viruspartikel (Hochberg, Souza et al.

2004). Somit ist EBV für Virostatika kaum zugänglich und Studien zeigten, dass deren Einsatz keinen Einfluss auf die Schwere oder Dauer einer IM hat (Kenney 2007).

Bei EBV-induzierten Tumoren ist die Situation ähnlich, denn auch hier ist das Virus in der latenten Phase des Zykluses (Forte and Luftig 2011). So befinden sich die Burkitt-Lymphomzellen in Latenz I und exprimieren mit EBNA1 nur ein einziges virales Protein und kaum microRNAs. Die Zellen des Hodgkin-Lymphoms und Nasopharyngealkarzinoms exprimieren nur einige wenige Proteine mehr und befinden sich damit in Latenz II (Forte and Luftig 2011). Als eine mögliche Therapieoption könnten die Tumorzellen in die lytische Phase getrieben werden, z.B. über Chemotherapeutika oder die Transfektion von frühen lytischen Genprodukten (z.B. BZLF1). Dadurch würden die Zellen lysieren und der Tumor sich selbst limitieren. Um eine Ausbreitung und Infizierung neuer Zellen zu verhindern, könnten die replizierenden Viren dann über Virostatika minimiert werden (Kenney 2007).

1.2. MicroRNAs

Als microRNA, kurz miRNA, bezeichnet man kleine regulatorische RNAs mit einer Länge von ~22 Nukleotiden (Hydbring and Badalian-Verly 2013). Sie wurden bereits in Nematoden, Pflanzen, Viren und Säugetieren nachgewiesen (Bartel 2004). Durch die Bindung an die 3' UTR von mRNA regulieren sie deren Translation und greifen damit in verschiedenste Prozesse, wie z.B. Zellteilung, Apoptose, Fettstoffwechsel oder die pflanzliche Blütenentwicklung ein (Bartel 2004, Hydbring and Badalian-Verly 2013).

1.2.1. Synthese der miRNAs

miRNAs sind im gesamte Genom codiert, wobei sie meist in Introns lokalisiert sind, aber auch in Exons von Pseudogenen (Bartel 2004, Hydbring and Badalian-Verly 2013). Sie werden dabei durch die Prozessierung aus verschiedenen Vorstufen gebildet (Abbildung 1). Zunächst entsteht über die Transkription durch die RNA-Polymerase II oder III eine primäre miRNA (pri-miRNA), welche aufgrund ihrer komplementären Enden eine Haarnadelstruktur ausbildet. Anschließend wird die pri-miRNA von dem Proteinkomplex Drosha/DGCR8 verkürzt und über Exportin-5 und Ran-GTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Hydbring and Badalian-Verly 2013). Die entstandene miRNA-Vorstufe (pre-miRNA) hat nun eine Länge ~70 nt (Lee, Jeon et al. 2002). Die Nuklease Dicer zählt vom 5' Ende und entfernt mit Hilfe der RNA-Polymerase III die Haarnadelstruktur, so dass ein 22 nt langer miRNA/miRNA-Duplex entsteht. Davon wird

meist nur ein Strang über Ago2 in den RNA-induzierten Silencing-Komplex, kurz RISC, integriert und dient dort als Erkennungssequenz für die spezifische Bindung an mRNA (He and Hannon 2004, Hydbring and Badalian-Verly 2013).

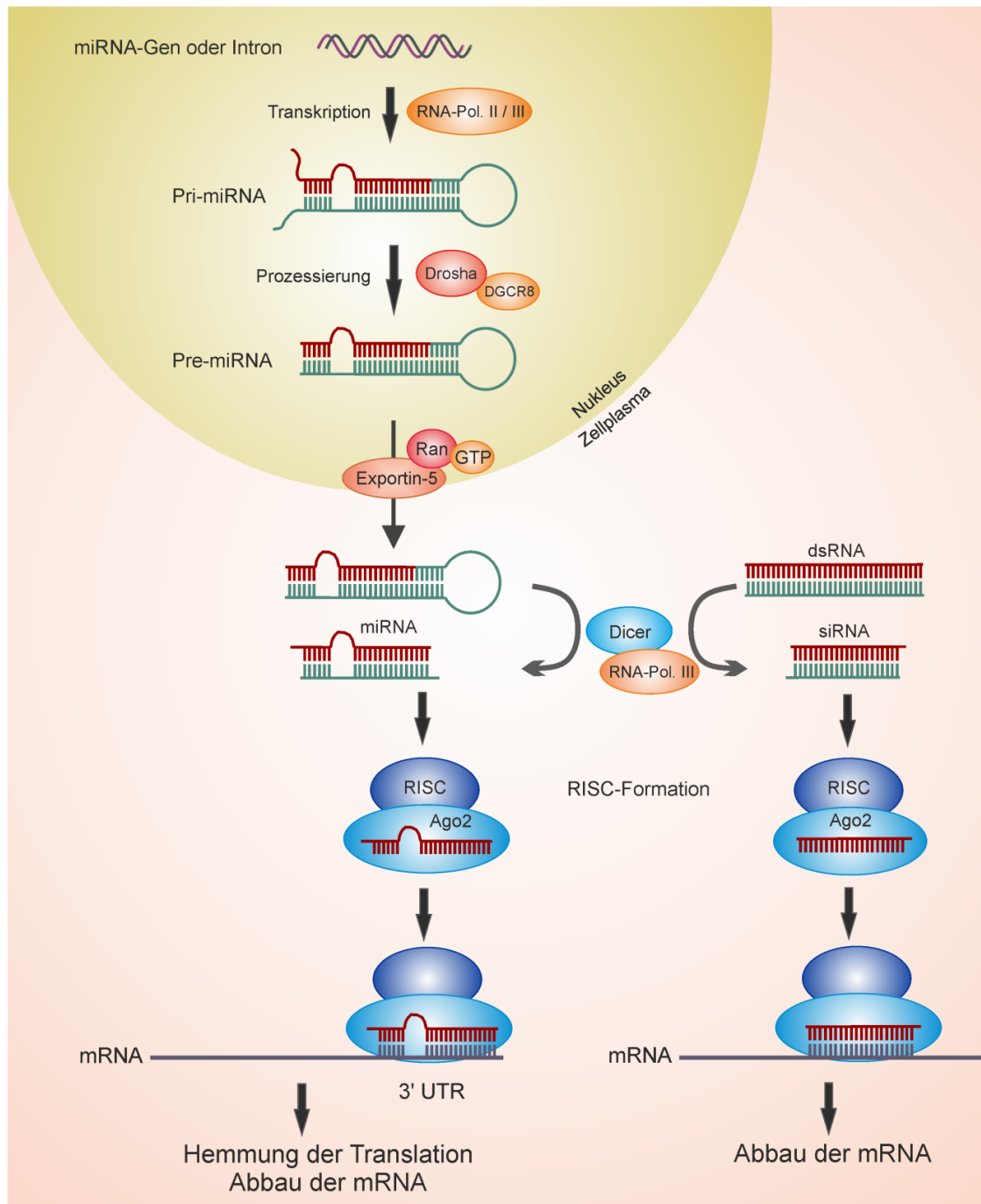


Abbildung 1: Syntheseweg und Translationskontrolle von miRNA und siRNA.

(Quelle: Eigenerstellung)

1.2.2. Regulation der Genexpression durch miRNAs

Die wichtigste und am besten untersuchte Funktion der miRNA ist die Regulation der Translation. Für eine optimale Komplexierung zwischen miRNA und mRNA sind 2 Regionen der kleinen regulatorischen RNA von Bedeutung: die Kernsequenz („Seed“) am 5′ Ende zur Erkennung der mRNA und die Ankerregion am 3′ Ende zur Stabilisierung der Bindung (Chen, Chen et al. 2010). Die Kernsequenz umfasst die Basen 2 bis 7 der miRNA und sollte vollständig komplementär zur mRNA sein. Eine zusätzliche Bindung über die Basen 1 und/oder 8 hat keinen Einfluss auf die Funktionalität der miRNA (Hydbring and Badalian-Verly 2013). Mutationen in der *Seed*-Region hingegen haben enormen Einfluss auf die Bindungsspezifität- und -stabilität (Doench and Sharp 2004). Dabei ist es unerheblich, ob die Mutation in der mRNA- oder der miRNA-Sequenz besteht. Die daraus resultierende unvollständige Komplementarität in der *Seed*-Region kann jedoch zum Teil über die restliche Sequenz kompensiert werden. Es ist bereits bekannt, dass jede miRNA viele verschiedene mRNAs regulieren kann (Doench and Sharp 2004). Durch die Kompensation von Fehlpaarungen in der Kernregion erhöht sich die Zahl der potentiellen Ziel-mRNA nochmals. Jedoch trägt jede 3′ UTR nicht nur eine, sondern viele Bindungsstelle für verschiedene miRNAs. Die Regulation einer einzigen miRNA muss also keinen großen Effekt auf die Translation der entsprechenden mRNA haben (Hydbring and Badalian-Verly 2013).

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass miRNAs möglicherweise auch die Transkription regulieren. So wurde RISC im Zellkern nachgewiesen. Ein Ago/miRNA-Komplex konnte jedoch nicht gefunden werden (Makarova, Shkurnikov et al. 2016). Zur Klärung von Funktion und Wirkungsmechanismus des RISC sowie die mögliche Beteiligung von miRNAs im Nukleus bedürfen noch weitere Untersuchungen.

1.2.3. Vorkommen und Verbreitung im menschlichen Organismus

Die Bildung der miRNAs verläuft zwar innerhalb der Zelle, dennoch findet man sie auch in hohen Konzentrationen im extrazellulären Raum. So konnten miRNAs in allen Körperflüssigkeiten gefunden werden, inklusive Liquor, Amnionflüssigkeit und sogar Muttermilch (Weber, Baxter et al. 2010). Ursache dafür ist eine Sezernierung von miRNA zur Kommunikation mit anderen Zellen. 2007 konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass sowohl funktionale miRNA aber auch mRNA in Vesikeln, sogenannten Exosomen, verpackt und im Körper transportiert werden können (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Über Co-Kulturexperimente wurde gezeigt, dass bestimmte miRNAs in den Zielzellen

akkumulieren und dort auch die Genexpression regulieren können (Pegtel, Cosmopoulos et al. 2010, Meckes, Gunawardena et al. 2013). *In vivo* Untersuchungen an Mäusen weisen zudem darauf hin, dass sie zur Kommunikation zwischen Immunzellen dienen. Dabei wurden den Mäusen Exosomen injiziert, welche die immunoregulatorische miRNAs miR-155 oder miR-146a enthielten und eine pro-inflammatorische (miR-155) bzw. eine anti-inflammatorische Antwort (miR-146a) gegen Endotoxine hervorriefen (Alexander, Hu et al. 2015).

Interessant dabei ist, dass extrazelluläre miRNAs extrem stabil sind. Sie können sowohl RNasen und pH-Schwankungen, als auch extreme Temperaturen und eine lange Lagerung überleben (Turchinovich, Tonevitsky et al. 2016). Es wurde angenommen, dass die Verpackung in Exosomen Ursache dafür wäre. Neuere Studien zeigten jedoch, dass etwa 95 % der extrazellulären miRNAs nicht in Vesikeln zu finden sind, sondern nur an Ago-Proteinkomplexen gebunden vorliegen (Arroyo, Chevillet et al. 2011). Diese sind selbst sehr stabil und konnten auch in Exosomen nachgewiesen werden. Damit ist dies die wahrscheinlichste Erklärung für die Robustheit von miRNAs (Turchinovich, Tonevitsky et al. 2016).

1.2.4. Nachweismethoden von microRNAs

Aufgrund ihrer geringen Größe ist der Nachweis von miRNAs schwierig. Anfänglich wurden sie zumeist über Northern Blots detektiert (Cai, Schafer et al. 2006, Xing and Kieff 2007). Auch die ersten viralen miRNAs konnten mit dieser Methode gefunden werden (Pfeffer, Zavolan et al. 2004). Nachteilig beim Northern Blot ist jedoch, dass diese sehr zeitaufwendig ist und man enorme Mengen an RNA benötigt (van Rooij 2011). 2005 entwickelte Chen *et al.* eine PCR-basierte Methode, um miRNAs spezifisch und schnell quantifizieren zu können (Chen, Ridzon et al. 2005). Aufgrund ihrer kurzen Sequenz ist dabei keine konventionelle PCR möglich. Die miRNA wird deshalb in der Reversen Transkription (RT) über einen spezifischen Primer verlängert, welcher, wie auch die miRNA-Vorstufen, eine Haarnadelstruktur aufweist. Die so entstehende, etwa 35-40 nt lange cDNA kann anschließend als Matrize für die PCR dienen. Um die Spezifität zu erhöhen wird eine Echtzeit-PCR mit spezifischen Taqman-Sonden durchgeführt (Chen, Ridzon et al. 2005). Hier liegt der Nachteil jedoch im hohen Kostenaufwand, da für jede miRNA ein spezifischer Vorwärtsprimer, RT-Primer und Taqman-Sonde benötigt werden. Von dieser Methode ausgehend, gibt es verschiedene Weiterentwicklungen. So kann die miRNA in der PCR einfach mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, welcher mit

doppelsträngiger DNA interkaliert, detektiert werden (Varkonyi-Gasic, Wu et al. 2007). Alternativ kann die miRNA in der RT zunächst über einen Poly(A)-Anhang verlängert werden. An diesen bindet dann ein Rückwärtsprimer, welcher neben einer Poly(T)-Sequenz auch eine einzigartige Nukleotidsequenz aufweist (Kang, Zhang et al. 2012). Dieser Primer kann universell oder spezifisch für jede miRNA konstruiert werden. In der anschließenden PCR kann die cDNA ebenfalls über eine Taqman-Sonde oder SYBR Green detektiert werden (Gordanpour, Nam et al. 2012, Kang, Zhang et al. 2012).

Der spezifische Nachweis mittels PCR kann jedoch nur von bekannten miRNAs erfolgen, da für das Primerdesign die exakte Sequenz nötig ist. Die Identifizierung neuer miRNAs erfolgt deshalb über Sequenzierung (Pfeffer, Zavolan et al. 2004, Chen, Chen et al. 2010). Dabei werden die kleinen RNA-Fractionen an Adaptersequenzen gekoppelt, über welche die einzelnen Stränge an einen komplementären Oberflächen-gekoppelten Primer gebunden werden. Von diesem aus erfolgt dann die Sequenzierung, wobei jede Base an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und somit bei jedem Einbau einer Base unterschiedliche Farbsignale liefert. Die Sequenzierungsdaten werden dann mit einem Referenzgenom verglichen, um so die einzelnen miRNAs zu ermitteln. Vorteil dieser Methode ist, dass Tausende RNAs gleichzeitig identifiziert werden können und damit die Zahl der bekannten miRNAs stetig wächst (Shendure and Ji 2008, Chen, Chen et al. 2010).

1.3. EBV –assoziierte microRNAs

2004 war EBV das erste Virus, für das miRNAs nachgewiesen werden konnten. Damals wurden 5 virale pre-miRNAs und miRNAs identifiziert (Pfeffer, Zavolan et al. 2004). Bis heute sind 44 reife miRNAs bekannt, welche aus insgesamt 25 Vorstufen gebildet werden (Lo, Dawson et al. 2012). Alle miRNAs sind im 172 kb großen Genom ausschließlich in 2 Genen zu finden: BHRF1 und BART (Abbildung 2). Dabei sind in BHRF1 3 miRNAs codiert. miR-BHRF1-1 liegt in der 5' UTR, die anderen beiden in der 3' UTR des Transkripts (Pfeffer, Zavolan et al. 2004). Die BART-miRNAs hingegen sind in 2 großen Gruppen innerhalb der Introns lokalisiert (Edwards, Marquitz et al. 2008).

Die viralen miRNAs werden über denselben Syntheseweg hergestellt, wie die der Wirtszelle (Kim do and Lee 2012). Zudem besitzen viele virale und zelluläre miRNAs identische Erkennungssequenzen, so dass EBV-miRNAs die humanen imitieren bzw. mit ihnen in Konkurrenz treten. Deshalb kommt es bei einer EBV-Infektion nicht nur zur

Fehlregulation von mRNAs, sondern auch von vielen zellulären miRNAs (Chen, Chen et al. 2010).

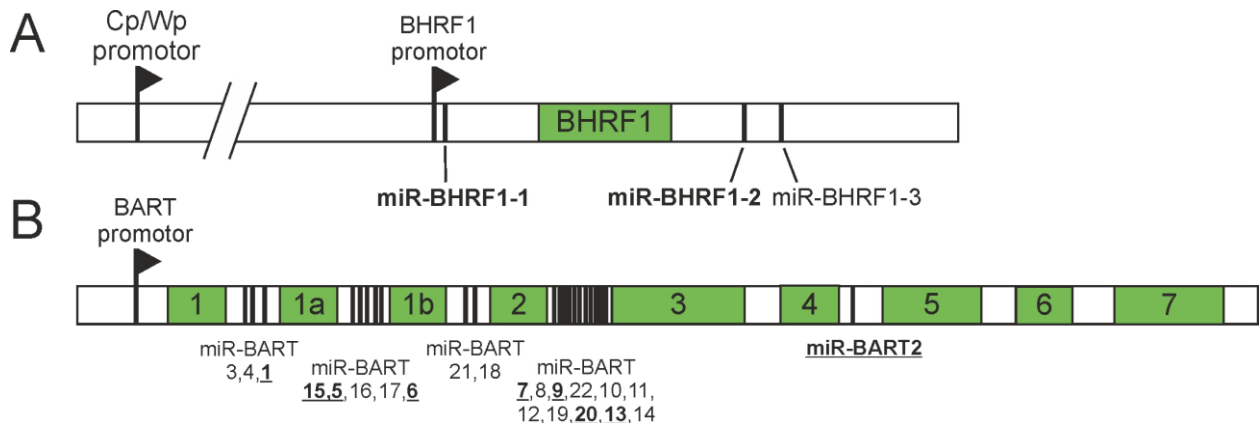


Abbildung 2: Lokalisation der EBV-miRNAs im Genom. In der oberen Abbildung ist das detaillierte BHRF1-Transkript dargestellt. BHRF1 kann vom Cp/Wp-Promotor aus transkribiert werden, wo alle BHRF-miRNAs gebildet werden. Alternativ kann es von seinem eigenen Promotor aus abgelesen werden, wodurch dann jedoch die miR-BHRF1-1 fehlt. In der unteren Abbildung ist das BART-Transkript dargestellt. Es beinhaltet 9 verschiedene Exons (1-7), welche variabel gespliced werden können. (Quelle: Eigenerstellung). Die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs sind unterstrichen.

1.3.1. Expressionsmuster

Die Expression der miRNAs scheint durch das Virus selbst streng reguliert zu sein, denn jede Phase des Lebenszyklus weist ein anderes Muster auf. So werden die miRNAs des BART-Clusters nur in den drei Latenzphasen exprimiert, wohingegen die des BHRF1-Clusters hauptsächlich während der Lyse auftreten (Xing and Kieff 2007, Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011, Forte and Luftig 2011).

BHRF1-miRNAs werden recht schnell nach Eintritt in die lytische Phase exprimiert. So konnten miR-BHRF1-2 und -3 schon vier Stunden nach Induzierung der Lyse nachgewiesen werden. miR-BHRF1-1 hingegen tritt erst nach 24-48 h auf, wenn der Cp/Wp-Promotor aktiv ist (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011). Dieser Promotor ist auch noch in der Latenz III angeschaltet, weshalb die BHRF1-miRNAs auch während dieser Phase detektiert werden konnten (Forte and Luftig 2011). In der Latenz II und I sind diese miRNAs hingegen nicht mehr zu finden (Cai, Schafer et al. 2006). Die BHRF1-miRNAs scheinen nur wichtig für die Transformation der B-Zellen zu sein, denn Zellen, welche mit miR-BHRF1 *knock-out* Viren infiziert wurden, zeigten erhöhte Apoptoseraten und reduziertes Immortalisierungspotential (Feederle, Haar et al. 2011). BHRF1-miRNAs werden in Latenz II und I also einfach nicht mehr benötigt, da die Zellen in diesem Stadium bereits zu B-Gedächtniszellen ausdifferenziert sind.

BART-miRNAs konnten zumeist in den Latenzphasen nachgewiesen werden (Forte and Luftig 2011). Es wird deshalb vermutet, dass diese hauptsächlich für die Erhaltung der Latenz von Bedeutung sind (Yang, Huang et al. 2013). So bindet BART2 beispielsweise an BALF5, eine DNA-Polymerase, und inhibiert damit die lytische Replikation (Barth, Pfuhl et al. 2008). Gebildet werden die BART-miRNAs während des Splicing-Prozesses des BART-Transkriptes, wobei ihre Konzentration stark von der Splice-Variante abhängig ist. Sie sind deutlich erhöht, wenn Exon 1 direkt an Exon 3 prozessiert wird, da bis auf miR-BART2 alle anderen BART-miRNAs im Bereich zwischen diesen beiden Exons lokalisiert sind (Edwards, Marquitz et al. 2008). Das Expressionslevel innerhalb der BART-miRNAs ist allerdings sehr variabel, so dass es noch andere Regulationsprozesse geben muss (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011).

Einige Untersuchungen konnten auch BART-miRNAs in der lytischen Phase nachweisen (Cai, Schafer et al. 2006, Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011). Nach Induzierung der Lyse blieben die Konzentrationen der BART-miRNAs jedoch gleich, obwohl die Expression der verschiedenen BART-Transkripte deutlich erhöht war (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011). Die detektierten miRNAs waren deshalb, vermutlich aufgrund ihrer Stabilität, nur Überreste aus der Latenz.

1.3.2. Regulation der Immunantwort und Tumorgenese

EBV-miRNAs greifen in eine Vielzahl von zellulären Prozessen ein. Nach Infektion versucht das Virus eine Erkennung durch das Immunsystem abzuwehren. miR-BHRF1-3 reguliert das Chemokin CXCL-11 und verhindert damit das Anlocken der T-Zellen (Xia, O'Hara et al. 2008). Zudem blockieren miR-BART2-5p und 3-5p die Expression von MICB (Nachmani, Stern-Ginossar et al. 2009, Forte and Luftig 2011). Dies lagert sich in der Zellmembran ab und dient als NK-Zell-Ligand. Ohne MICB und CXCL-11 werden die infizierten Zellen nicht erkannt und somit auch nicht zerstört (Nachmani, Stern-Ginossar et al. 2009). EBV-miR-BART11 greift in die Translation von FOXP1 ein, welches die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen sowie die Tumorgenese reguliert (Song, Li et al. 2016). Die miR-BART15 konkurriert mit der humanen miR-223 um die Bindungsstellen der 3' UTR von *NLRP3*, einem zentralen Protein des Inflammasom (Haneklaus, Gerlic et al. 2012, Wang, Wang et al. 2016). Damit inhibiert miR-BART15 aktiv die Inflammasombildung und die Bekämpfung der Infektion durch das Immunsystem. Durch ihre Verbreitung über Exosomen konnten EBV-miRNAs neben B-Zellen auch in anderen, nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Pegtel, Cosmopoulos et al. 2010,

Haneklaus, Gerlic et al. 2012). EBV kann somit die Immunantwort in potentiell allen Zellen kontrollieren.

EBV reguliert auf verschiedenen Ebenen die Zellproliferation und Apoptose, weshalb viele Tumore mit dem Virus assoziiert sind. Obwohl das BHRF1-Cluster für die Transformation von B-Zellen essentiell scheint (Feederle, Haar et al. 2011), wurden entsprechende miRNAs kaum in EBV-induzierten Tumoren nachgewiesen. Wahrscheinlich da die Tumorzellen in der Regel in den Latenzphasen verharren, bei denen hauptsächlich BART-miRNAs gebildet werden (Forte and Luftig 2011). So befinden sich die Zellen des Burkitt-Lymphoms in Latenz I, NPC und HL in Latenz II und bei PTLD in der Latenz III (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009, Forte and Luftig 2011). Deshalb scheinen vor allem die BART-miRNAs für die Tumorgenese wichtig zu sein (Lo, Dawson et al. 2012). So reguliert miR-BART5 das Apoptose-induzierende Protein PUMA und stabilisiert damit die Latenz (Choy, Siu et al. 2008). miR-BART9 hat dieselbe Erkennungssequenz wie die 2 humanen miRNAs, miR-200s und miR-141, und reguliert damit auch E-Cadherin, ein Zelladhäsionsprotein (Tsai, Liu et al. 2016). Eine andere miRNA, miR-BART6, kann die Expression von Dicer und EBNA2 steuern. Dadurch kontrolliert es die Expression von anderen miRNAs, aber auch die Zyklusphase des Virus (Iizasa, Wulff et al. 2010, Ramalingam, Kieffer-Kwon et al. 2012). Andere Wirtsproteine, wie Caspase 3, können potentiell von mehreren viralen miRNAs reguliert werden. So besitzt das entsprechende Transkript Erkennungssequenzen für miR-BART22, -1, -3 und -7. EBV greift also auf verschiedenen Wegen in die Apoptose ein (Ramalingam, Kieffer-Kwon et al. 2012).

EBV kann jedoch nicht nur über die eigenen miRNAs in die Regulation der Wirtszelle eingreifen, sondern beeinflusst auch humane miRNAs. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion die miR-155 hoch reguliert wird. Diese steuert viele Transkriptionsfaktoren und fördert damit die Proliferation und verhindert gleichzeitig die Apoptose (Forte and Luftig 2011).

1.4. Regulatorische RNAs als Therapiemöglichkeit

Aufgrund ihrer zentralen Funktion bei der Steuerung von verschiedenen Zellprozessen werden miRNAs als neue Möglichkeiten für die Behandlung von Krankheiten angesehen. Dabei gibt es verschiedene Ansätze die Expression von miRNA und ihren Zielgenen zu regulieren. So kann eine fehlende miRNA durch die Übertragung von Expressionsvektoren mit Vorstufen der miRNA oder reifer synthetischer miRNA kompensiert werden (Merhautova, Demlova et al. 2016). Bei vielen Tumorarten sind Tumorsuppressor-miRNAs herunter reguliert. Einige Studien konnten nachweisen, dass ein Ausgleich dieses Defizites über exogene miRNA eine Eindämmung des Tumorwachstums bewirkt (Wagner 2015). So ist in einigen Tumoren die Expression der humanen miR-34 reduziert, welche durch p53 induziert wird und das Apoptoseverhalten der Zelle beeinflusst (Cortez, Ivan et al. 2016). Es wurde bereits ein Therapeutikum entwickelt, welches in Liposomen verpackte miR-34 enthält (MRX34) und damit die fehlende Expression kompensiert (Monroig-Bosque Pdel, Rivera et al. 2015). Durch die Normalisierung des miR-34-Expressionslevels konnte in allen Studien eine Reduzierung des Tumorwachstums im Xenograft-Mausmodell erreicht werden (Merhautova, Demlova et al. 2016). Die Autoren schlussfolgern dass, dramatische Krankheitsverläufe damit verhindert werden könnten, eine vollständige Heilung jedoch nicht zu erwarten wäre.

Ein anderer Therapieansatz richtet sich gegen überexprimierte miRNAs. Diese können über die Bindung an ein komplementäres Oligonukleotid, so genannte anti-miRs, inaktiviert werden (Wagner 2015). Bei Brustkrebs sind 2, für das Zellwachstum wichtige, miRNAs besonders stark exprimiert: miR-21 (Apoptosehemmung) und miR-10b (Metastasierung). In Nanopartikel verpackte anti-miRs gegen diese beiden erzielten im Mausmodell ein gehemmtes Tumorwachstum und eine reduzierte Streuung des Tumors (Devulapally, Sekar et al. 2015). Anti-miRs eignen sich auch für die Therapie von Virusinfektionen. So basiert *Miravirsen* (SPC3649) auf einem *Antisense*-Oligonukleotid gegen miR-122 und ist für die potentielle Therapie von chronischen Hepatitis C-Infektionen (HCV) konzipiert (Gebert, Rebhan et al. 2014). miR-122 spielt eine zentrale Rolle für die Stabilität und Replikation der HCV-RNA und ist deshalb bei einer Infektion stärker exprimiert. In einer Phase II-Studie mit 36 Probanden konnte durch Miravirsen eine deutliche Reduktion des HCV-Titers im Plasma erreicht werden, wobei dieser Effekt auch noch mehrere Wochen nach Medikamentengabe anhielt (Janssen, Reesink et al. 2013). Das anti-miR-basiertes Therapeutikum Fomivirsen (Vitravene®) wurde bereits

1998 zur Behandlung von Zytomegalievirus (CMV)-induzierter Retinitis bei HIV-Patienten zugelassen (Jiang 2013, Chery 2016).

Eine weitere Therapiemöglichkeit ergibt sich durch den Einsatz einer anderen kleinen RNA: die *small interfering* RNA, kurz siRNA. Diese ist der miRNA sehr ähnlich. Gebildet wird sie aus einem 30 - 100 nt langem Doppelstrang, welcher im Gegensatz zur miRNA-Vorstufe keine Haarnadelstruktur aufweist (Abbildung 1). Die reife, etwa 20-23 nt lange siRNA lagert sich ebenfalls an der 3' UTR der mRNA an, ist jedoch vollständig komplementär und damit hochspezifisch, so dass sie nur an eine einzige mRNA bindet (Lam, Chow et al. 2015). Mit Hilfe von siRNA wird eine neuartige Therapie für HCV-Infektionen entwickelt. Die eingesetzte siRNA, welche gegen die für die Virusreplikation essentielle Proteinkinase PKN2 gerichtet war, erzielte im Xenograft-Mausmodell eine Reduktion des PKN2-Proteinlevels in der Leber um ~80 % und des HCV-Titers im Serum um mehr als eine Log₁₀-Stufe (Moon, Lee et al. 2016, Park, Jeon et al. 2016). siRNA ist aber auch potentiell Therapeutikum für verschiedene Tumorarten. So wurden bereits gute Erfolge im Mausmodell mit siRNA beim Lungenkarzinomen (STAT3, Transkriptionsfaktor), Ovarialkarzinom und Hirntumoren (VEGF, Signalmolekül für Angiogenese und Immunzellen) sowie bei Melanomen (Mcl1, Anti-Apoptose-Faktor) erzielt. Es gibt aber auch vielversprechende Ansätze für eine siRNA-basierte Therapie von Asthma oder Sepsis (Lam, Chow et al. 2015).

Regulatorische RNAs wie miRNA und siRNA bieten also gute therapeutische Ansätze vor allem für Erkrankungen wie EBV-Infektionen, die für konventionelle Medikamente nicht zugänglich sind oder wo verfügbare Therapien starke Nebenwirkungen hervorrufen.

1.5. Ziele der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine geeignete PCR-basierte Methode entwickelt und evaluiert werden, um EBV-miRNAs im Patientenmaterial (Vollblut) nachweisen zu können. Hierfür sollten verschiedene Protokolle getestet und evtl. modifiziert werden. Problematisch dabei ist, dass EBV-miRNAs ähnliche Sequenzen wie humane miRNA besitzen, wobei die Molekülzahl der viralen miRNA im Wirtsorganismus wahrscheinlich um ein Vielfaches geringer ist. Das zu entwickelnde Protokoll sollte deshalb vor allem hoch spezifisch für EBV-miRNAs sein, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Expressionsprofile der viralen miRNA in verschiedenen Phasen der Infektion analysiert werden. Diese Daten sollten dann als Grundlage für die

mögliche Identifikation einer zugänglichen, therapeutisch nutzbaren miRNA dienen. Während zum Stadium der Erstinfektionen schon einige Untersuchungen publiziert wurden, wurde die virale miRNA-Expression während der Reaktivierungsphase bislang nicht untersucht. Für die Analysen der Infektionsphasen sollten im Rahmen einer klinischen Studie Proben gesammelt und mit der zuvor validierten Methode analysiert werden. Die gewonnen Real-Time PCR-Ergebnisse sollten dann relativ quantifiziert und hoch exprimierte miRNAs identifiziert werden.

Des Weiteren sollte in vitro ein neuer Therapieansatz für EBV-Infektion getestet werden: Mit Hilfe von siRNA sollte die Expression in infizierten B-Zellen reguliert werden. Hierfür sollte zunächst ein Protokoll zur Transfektion von siRNA in B-Zellen etabliert werden, um anschließend eine neue Art von siRNA, so genannte „intelligente“ siRNA transfizieren zu können. Die „intelligente“ siRNA ist über die Kopplung an ein Peptid zunächst inaktiviert. Durch das Design eines spezifischen Peptides sollte die siRNA nur in EBV-infizierten Zellen, welche eine bestimmte virale Protease exprimieren, die das Peptid abspaltet, ihre Wirkung entfalten.

2. Material

2.1. Zelllinien

Tabelle 1: Eingesetzte Zellen für die Transfektion

Bezeichnung	Hersteller
EBV-LCL	Patientenisolat, Humangenetik FSU Jena
Reh (ATCC® CRL-8286™)	LGC Standards GmbH; Wesel, Deutschland

2.2. Verwendete Kits

Tabelle 2: Auflistung aller Kits, die in der Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Hersteller
miRNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>mirVana</i> ™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
miScript II RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Neon® Transfection System 10 µl Kit	Invitrogen; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, USA

2.3. Reagenzien für PCR

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Fertigkits für die PCR

Bezeichnung	Hersteller
SsoAdvanced™ PreAmp Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
miScript SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rotor-Gene Probe PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.4. Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Sequenzen für die RNA-Oligonukleotide (synthetische miRNAs) wurden der miRBase (www.mirbase.org) entnommen. Das Sondendesign, RT-Primer und einige der Vorwärtsprimer der EBV-miRNAs stammen von Cosmopoulos *et al.* (2009), welche jedoch zum Teil am 3'-Ende um 2-4 Basen gekürzt wurden. Das Primerdesign für die humane miR-16 wurde aus Chen *et al.* (2004) entnommen.

Tabelle 4: Verwendete Primer, synthetische miRNAs und Taqman-Sonden.

Bezeichnung	Sequenz
BHRF1-1	
RNA Oligonukleotid	5'-uaaccugaucagccccggaguu-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACTCCGG-3'
for	5'-CGTAACCTGATCAGCC-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGUAACCUGAUCAGCCCC-3'
for Cosm. et al -4	5'-ACACTCCAGCTGGGUAACCUGAUCAG-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-ACCTGATCAGCCCCGGAG-MGB-Dabsyl-3'
BHRF1-2	
RNA Oligonukleotid	5'-uauuuuugcgagagaaauuga-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTTCAATTT-3'
for	5'-GTATCTTTTGCAGCAG-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGUAUCUUUUGCGGCAGA-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-GTTCAATTTCTGCCGCAAA-MGB-TAMRA-3'
BART1-5p	
RNA Oligonukleotid	5'-ucuuaguggaagugacgugcugug-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAGCACG-3'
for	5'-TGTCTTAGTGGAAGTGACGT-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGTCTTAGTGGAAGTGA-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGACAGCACG-MGB-Dabsyl-3'
BART2-5p	
RNA Oligonukleotid	5'-uauuuucugcauucgcccugc-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCAAGGGC-3'
for	5'-TATTTCTGCATTCGCC-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGTATTTTCTGCATTC-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGGCAAGGGC-MGB-Dabsyl-3'
BART5-5p	
RNA Oligonukleotid	5'-caaggugaauauagcugcccaucg-3'

RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGATGGGC-3'
for	5'-CGTCAAGGTGAATATAGCT-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGCAAGGTGAATATAGCT-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGCGATGGGC-MGB-Dabsyl-3'
BART6-5p	
RNA Oligonukleotid	5'-uaagguugguccaauccauagg-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCTATGGA-3'
for	5'-TAAGGTTGGTCCAATCC-3'
for Cosm. et al	ACACTCCAGCTGGGTAAGGTTGGTCCA
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGCCTATGGA-MGB-Dabsyl-3'
BART7-3p	
RNA Oligonukleotid	5'-caucauaguccaguguccaggg-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCCTGGAC-3'
for	5'-TGCATCATAGTCCAGTGTC-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGCATCATAGTCCAGT-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGCCCTGGAC-MGB-Dabsyl-3'
BART9-3p	
RNA Oligonukleotid	5'-uaacacuucaugggucccguaugu-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACTACGGGA-3'
for	5'-TCTGTAACACTTCATGGG-3'
BART13-3p	
RNA Oligonukleotid	5'-uguaacuugccagggacggcuga-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAGCCGT-3'
for	5'-GTGTAACCTGCCAGGG-3'
BART15-3p	
RNA Oligonukleotid	5'-gucagugguuuuguuuccuuga -3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAAGGAA-3'
for	5'-GCT GTCAGTGGTTTTGT-3'
for Cosm. et al	5'-ACACTCCAGCTGGGGTCAGTGGTTTTGT-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-TTCAGTTGAGTCAAGGAA-MGB-Dabsyl-3'
BART20-5p	
RNA Oligonukleotid	5'-uagcaggcaugucucauucc-3'
RT-Primer	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGAATGAA-3'
for	5'-AAGTAGCAGGCATGTC-3'
miR-16	
RNA Oligonukleotid	5'-uagcagcacguaauauuggcg-3'
RT-Primer	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC CGCCAA-3'
for	5'-CGCGCTAGCAGCACGTAAAT-3'

reverse	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
Taqman-Sonde	5'-6-FAM-ATACGACCGCCAATAT-MGB-TAMRA-3'
Universal rev	5'-GTGTCGTGGAGTCGGCA-3'
GAPDH for	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
GAPDH rev	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
AGAP for	5'-GAAAGTCCCAGGGAAGAGGC-3'
AGAP rev	5'-GGAGTCACCCAGCCCTGT-3'
18s RNA for	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'
18s RNA rev	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
β-Actin for	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
β-Actin rev	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'
siRNA AGAP sense	5'-CCCAGACAAAGAGAAGAAA[dT][dT]-3'
Peptid-siRNA AGAP anti-sense	5'-His-Leu-Val-Glu-Ala-Ser-[AmC6F]UUUCUUCUCUUUGUCUGGG[dT][dT]-3'
siRNA AGAP anti-sense	5'-UUUCUUCUCUUUGUCUGGG[dT][dT]-3'
AGAP Loop	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGAT-3'
siRNA GAPDH sense	5'-GGUCAUCCAUGACAACUUU[dT][dT]-3'
siRNA GAPDH anti-sense	5' [AmC6F]AAAGUUGUCAUGGAUGACC[dT][dT]-3'
Scrb1 siRNA sense	5'-GCCACUUAUAAAUUCGUUC[dT][dT]-3'
Scrb1 siRNA anti-sense	5'-GAACGAAUUUAUAAGUGGC[dT][dT]-3'

2.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
RNase-freies Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,8 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TBE-Puffer (10x)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,
	Deutschland			
RPMI 1640 Flüssigmedium mit 20 mM HEPES, mit stabilem Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland			
Low Range GeneRuler	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA			
Loading Dye 6x	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, USA			
Fetales Kälberserum	Lonza, Thermo Fisher Scientific, USA			
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA			
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, USA			
Heparin Natriumsalz	Sigma-Aldrich	Chemie	GmbH,	München,
	Deutschland			

2.6. Sonstige Materialien

Tabelle 6: Weitere Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Gel cassettes, mini, 1,5 mm	Thermo Fisher Scientific, USA
Hard-shell 96-well plate, white shell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Microplate, 96-well, clear	Greiner Bio One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microseal 'B' Adhesive Seal	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
K3-EDTA Monovetten 9ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

2.7. Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Reverse Transkription/ PCR	
Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mastercycler 5330	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
CFX Connect Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GeneTouch Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zentrifugen	

Centrifuge 5424 R	Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Universal 30 RF	Hettich Lab Technologies, Tuttlingen, Deutschland
Gelektrophorese	
XCell SureLock™ Mini-Cell	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Major Science Power Supply	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sonstige Geräte	
Vortexer	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
NanoDrop2000	PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
Neon® Transfection System	Invitrogen; Life Technologies GmbH, Darmstadt
G:Box	Syngene, United Kingdom
HeraSAFE HS 12	Thermo Fisher Scientific, USA
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, USA

2.8. Computerprogramme

Tabelle 8: Auflistung der Software

Bezeichnung	Hersteller
Rotor-Gene Q Series Software	Qiagen, Hilden, Deutschland
CFX Manager	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CorelDraw X6	Corel Corporation, Kanada
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, USA

3. Methoden

3.1. RNA-Isolation

3.1.1. Aufreinigung von Total-RNA mit der Säulenmethode

Zur Isolation von Total-RNA inklusive miRNAs wurde das miRNeasy Mini Kit oder das *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte dabei aus jeweils 200 µl Vollblut. Bei dem miRNeasy Mini Kit wurde das Blut mit 1 ml QIAzol lysiert und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt. Das Verhältnis Blut/QIAzol/Chloroform betrug immer 1:5:1. Die weitere Aufreinigung erfolgte laut Herstellerprotokoll. Das Eluatvolumen betrug 50 µl. Für die Aufreinigung der RNA mittels *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit wurde 1 Teil Blut mit 1 Teil Lysepuffer versetzt und gut gemischt. Danach wurde das Lysat mit demselben Volumen saurem Phenol/Chloroform gemischt und laut Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 100 µl Wasser.

Für die RNA-Analysen der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen in 700 µl QIAzol lysiert und nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser.

Die isolierte RNA wurde jeweils am NanoDrop2000 überprüft und die Konzentration gemessen.

3.1.2. Aufreinigung mit der Phenol/Chloroform-Methode

Zur Lyse des Vollblutes wurde, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, das Vollblut im Verhältnis 1:5:1 mit TRIzol und Chloroform lysiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 5 min bei 11000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit 2 Volumen 99,8% Ethanol vermischt und die RNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation bei 15000 rpm und 4 °C für 30 min wurde das RNA-Pellet 2x in 500 µl 70 %ig Ethanol gewaschen und anschließend unter dem Abzug getrocknet. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die Konzentration am NanoDrop2000 bestimmt.

3.1.3. Aufreinigung von miRNA

Die Isolation der miRNA erfolgte aus 300 µl Vollblut. Dieses wurde mit 1200 µl QIAzol Lysis Reagent versetzt, 20 s gevortext und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Chloroform zugegeben und intensiv gemischt. Nach einer Inkubation von 2 min wurden die Proben für 15 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu

erreichen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit dem miRNeasy Mini Kit weiterverarbeitet. Die weitere Aufreinigung zur Aufkonzentration der kleinen RNA-Fractionen (< 200 nt) erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der RNA erfolgte in 22 µl RNase-freiem Wasser.

Auf eine Messung der RNA-Konzentration wurde verzichtet, da größere messbare RNAs nicht mit isoliert wurden und ein konstantes Volumen in der Reversen Transkription zum Einsatz kam.

3.2. Reverse Transkription

3.2.1. RT mit geloopten Primern

Das Protokoll der Reversen Transkription orientierte sich an zwei Publikationen (Chen, Ridzon et al. 2005, Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009). Von der isolierten miRNA wurden konstant 5 µl eingesetzt in einem Gesamtreaktionsvolumen von 15 µl. Als Positivkontrolle diente alternativ 1 µl eines Gemisches aller synthetischen miRNAs. Diese wurden mit einem Mix der geloopten Primer inkubiert, wobei die Konzentration jedes Primers in der Reaktion 50 nM betrug. Die Anlagerung der Primer erfolgte im Mastercycler 5330 bei 85 °C für 5 min und anschließend 60 °C für ebenfalls 5 min.

Reaktionsansatz: 1x Reaktionspuffer
 0,13 U/µl RNase-Inhibitor
 0,25 nM je dNTP
 3,3 U/µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase

Nach Zugabe des Reaktionsansatzes wurde alles zunächst für 30 min bei 16 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Synthese der cDNA bei 42 °C für 40 min und die Inaktivierung bei 85 °C für 10 min.

Im Verlauf des Validierungsprozesses wurden verschiedene Variationen des Protokolls getestet. So wurde anfänglich mit einer Primerkonzentration von nur je 12,5 nM gearbeitet oder für die Eliminierung von unspezifischen Signalen auf einen Primermix verzichtet und nur der spezifische RT-Primer für jede miRNA verwendet.

Transfektionserfolge wurden teilweise auch auf miRNA-Ebene untersucht, wobei hier insgesamt 200 ng Total-RNA in der RT eingesetzt wurden.

3.2.2. Poly(A)-RT

Mit dem miScript II RT Kit (Qiagen) wurden spezifisch miRNAs aus 300 ng Total-RNA unter Verwendung des *HiSpec Buffers* am 3'-Ende polyadenyliert und über den mitgelieferten Rückwärtsprimer transkribiert. Das weitere Protokoll erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.3. Transkription von mRNA

Zur Auswertung der Transfektion wurden 150 ng in einer 15 µl RT-Reaktion transkribiert. Dafür wurde die RNA zunächst mit 1 µl Hexameren für 5 min bei 72 °C inkubiert.

Reaktionsansatz: 1x Reaktionspuffer
1 mM je dNTP
0,27 U/µl RiboLock RNase Inhibitor
10 U/µl RevertAid Reverse Transcriptase

Nach Zugabe des Ansatzes wurde die Reaktion für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die Transkription erfolgte bei 42 °C für 60 min und anschließend 72 °C für 5 min zur Inaktivierung.

3.3. Präamplifikation

Zur Verstärkung der Signale in der qPCR, sowie zur Erhöhung der Sensitivität wurde eine Präamplifikation für alle Studienproben durchgeführt. Jeweils 4 µl RT-Ansatz mit der umgeschriebenen miRNA wurden in die 25 µl Reaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz: 1x SsoAdvanced™ PreAmp Supermix
50 nM je Vorwärtsprimer (für alle 12 miRNAs)
50 nM miR-16 rev Primer
550 nM universal rev Primer

Der Reaktionsansatz wurde mit der cDNA vermischt und anschließend im GeneTouch Thermal Cycler für 3 min bei 95 °C inkubiert. Danach folgten 15 Zyklen aus 15 s 95 °C und 4 min 60 °C. Für den Einsatz in der qPCR wurde die cDNA 1:20 (EBV-miRNA) bzw. 1:2000 (miR-16) verdünnt.

3.4. SYBR® Green-PCR

3.4.1. Studienanalyse

In der SYBR® Green-basierten PCR fand die eigentliche Quantifizierung der miRNAs statt. In dem 15 µl Ansatz wurden 2 µl verdünnte cDNA aus der Präamplifikation amplifiziert.

Reaktionsansatz: 1x SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
 1 µM Vorwärtsprimer
 1 µM universaler Rückwärtsprimer

Der gesamte PCR-Ansatz wurde im CFX Connect Real-Time System nach folgendem Protokoll amplifiziert:

30 s bei 98 °C	Aktivierung der Polymerase
15 s bei 95 °C	Denaturierung
30 s bei 62 °C	Primerhybridisierung + Elongation
Schritte 2-3: 45 Zyklen	

Die Analyse der Schmelzkurven erfolgte nach Beendigung der Amplifikation durch einen schrittweisen Anstieg (0,5 °C, 4 s) der Temperatur von 70 °C bis 95 °C.

3.4.2. Auswertung der Transfektion

Der Transfektionserfolg wurde sowohl auf mRNA- als auch auf miRNA-Ebene untersucht. Bei der mRNA wurden 18s RNA, GAPDH und AGAP untersucht.

Reaktionsansatz: 1x Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit
 400 nM Vorwärtsprimer
 400 nM Rückwärtsprimer
 1 µl cDNA

Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 15 µl aufgefüllt und im Real-Time Cyclyer amplifiziert nach folgendem Programm:

5 min bei 95 °C	
10 s bei 95 °C	
20 s bei 60 °C	Schritt 2+3: 40 Zyklen

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalysen durch einen schrittweisen Anstieg (0,5 °C, 5 s) von 65 °C bis 95 °C.

Zusätzlich wurde noch die miRNA-Expression bzw. die Übertragung der siRNA mit einer qPCR untersucht.

Reaktionsansatz: 1x SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix
 1 µM Vorwärtsprimer
 1 µM universaler Rückwärtsprimer
 1 µl cDNA

Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 15 µl aufgefüllt und im Real-Time Cyclor amplifiziert.

Programm: 30 s bei 98 °C
 5 s bei 95 °C
 20 s bei 62 °C Schritt 2+3: 35 Zyklen

Anschließend wurden wieder die Schmelzpeaks untersucht durch einen schrittweisen Anstieg der Temperatur (0,5 °C, 5 s) von 70 °C bis 95 °C.

3.5. Taqman-PCR

Mit dieser Methode konnten miRNAs detektiert werden, welche mit Hilfe eines geloopten RT-Primers transkribiert wurden (3.2.1).

Reaktionsansatz: 1x Rotor-Gene Probe PCR Kit
 1 µM Vorwärtsprimer
 0,5 µM universaler Rückwärtsprimer
 0,1 µM Taqman-Sonde
 1 µl cDNA

Der Ansatz wurde mit Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl aufgefüllt und im Rotor-Gene Q amplifiziert.

30 s bei 95 °C	Aktivierung der Polymerase
5 s bei 95 °C	Denaturierung
15 s bei 60 °C	Primerhybridisierung + Elongation
Schritte 2-3: 40 Zyklen	

3.6. miScript-PCR

Die Quantifizierung der mit dem miScript RT Kit umgeschriebenen miRNA erfolgte nach Herstellerangaben im 20 µl Ansatz. Es wurden sowohl mitgelieferte als auch eigene Vorwärtsprimer getestet.

Reaktionsansatz: 1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
 1 µM Vorwärtsprimer oder 1x miScript Primer Assay
 1x miScript Universal Primer
 0,5 µl cDNA

Die PCR wurde im CFX Connect Real-Time System oder im Rotor-Gene Q amplifiziert nach folgendem Protokoll:

15 min bei 95 °C	Aktivierung der Polymerase
15 s bei 95 °C	Denaturierung
30 s bei 55 °C	Primerhybridisierung
30 s bei 72 °C	Elongation
Schritte 2-4: 40 Zyklen	

Die anschließende Schmelzpunktbestimmung wurde durch eine schrittweise Erhöhung (0,5 °C, 5 s) der Temperatur von 65 °C bis 95 °C durchgeführt.

3.7. Studienanalyse

3.7.1. Probenasservierung und Analyse

Für die Studie wurde dem Patienten einmalig 9 ml EDTA-Vollblut entnommen, bei 4°C gekühlt, innerhalb von 24 h aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Für die miRNA-Isolation wurde jeweils ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und vor der Entnahme von 300 µl Vollblut nochmals gut gemischt. Die Analyse jeder Probe erfolgte nach dem in Abbildung 3 aufgeführten Schema. Für jede miRNA wurde somit letztendlich eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Bei stark schwankenden Ergebnissen wurden die Testungen mindestens 1x wiederholt, um die Daten zu überprüfen.

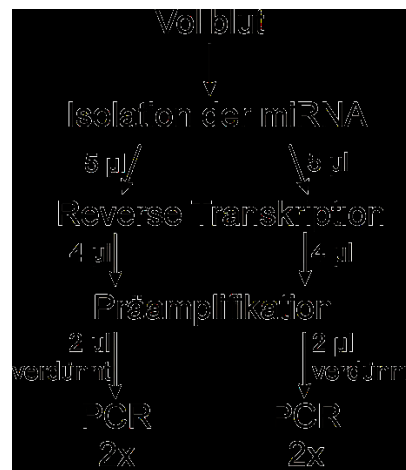


Abbildung 3: Ablaufschema der Probenanalyse. Die Isolation der miRNA erfolgte nach Abschnitt 3.1.3, die RT nach Abschnitt 3.2.1, die Präamplifikation nach Abschnitt 3.3 und die PCR nach dem Protokoll in Abschnitt 3.4.

3.7.2. Ermittlung der Standardkurven

Für jede miRNA wurde unter Verwendung des Gemisches aus synthetischer miRNA eine Standardkurve bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen reichten über 6 Stufen von 2×10^5 bis 64 Moleküle (5-fache Verdünnung) in der PCR und wurden jeweils doppelt bestimmt. Die erhaltene Formel diene als Ausgangspunkt für die Berechnung der Moleküle von den unbekannten Proben.

$$y = \log_{10} \left(\frac{1}{x} \right) \quad \text{mit } x = \text{Moleküle pro µl} \quad \text{als Schnittpunkt y=0,1}$$

3.7.3. Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung erfolgte aus den C_T -Werten über die Effizienz-korrigierte Formel (Pfaffl 2001):

$$\text{rel. Expression} = \frac{(E_{\text{EBV miRNA}})^{\Delta C_T^{\text{EBV miRNA}} (\text{seroneg.} - \text{Probe})}}{(E_{\text{miR-16}})^{\Delta C_T^{\text{miR-16}} (\text{seroneg.} - \text{Probe})}}$$

Alle Werte wurden auf eine Vergleichsgruppe von 14 seronegativen Patienten relativiert, wobei der jeweilige Mittelwert der C_T -Werte verwendet wurde. Für die Kalkulation dieser Mittelwerte wurde für nicht nachweisbare miRNAs ein theoretischer C_T angenommen, welcher sich aus der jeweiligen Standardkurve für 0 Moleküle errechnete. Die Effizienz E berechnete sich aus dem jeweiligen Anstieg der Standardkurve der einzelnen miRNA

(Effizienz = $10^{-1/m}$). Zusätzlich wurden alle miRNAs nochmal über die Standardformel für die relative Quantifizierung $2^{-\Delta Ct}$ verglichen.

Für die Ermittlung des Transfektionserfolges wurden die in der PCR ermittelten C_T -Werte zunächst auf ein Referenzgen (18s-RNA und/oder β -Actin) normalisiert. Danach wurden die Werte auf eine Kontrolle ohne Elektroporation relativiert unter Verwendung der Formel:

$$\text{Rel. Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.7.4. Absolute Quantifizierung

Die Kalkulation der miRNA-Moleküle in 300 µl Blut ergibt sich durch die Formel:

$$\text{abs. Expression} = \text{kalk. Moleküle} \cdot 250 / \text{Präamp Faktor} \cdot 3,75 \cdot 4$$

VF PCR
VF Präamp
VF RT

Der Vermehrungsfaktor (VF) in der Präamplifikation wurde durch den einmaligen Vergleich bzw. Quantifizierung von Standards bekannter Konzentration vor und nach Präamplifikation bestimmt (

Tabelle 9).

Tabelle 9: Vermehrungsfaktor der Moleküle durch die Präamplifikation

miRNA	Faktor
BHRF1-1	7711,4
BHRF1-2	7,7
BART1-5p	1198,5
BART2-5p	240,8
BART5-5p	2356,4
BART6-5p	1987,4
BART7-3p	4515,8
BART9-3p	700,8
BART13-3p	2107,9
BART15-3p	89,6
BART20-5p	0,3
miR-16	5257,0

3.8. Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software) durchgeführt. Die Ermittlung der Expressionsunterschiede, Vergleich der Viruslasten sowie die Auswertung der Transfektionseffizienzen erfolgten über einen Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test mit einem beidseitigen Konfidenzintervall von 95 %. Zur Analyse von gekoppelten miRNAs wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ρ (beidseitiger Konfidenzintervall 95 %) berechnet.

3.9. Acrylamidgele

Für die kleinen Amplifikate der miRNA-PCR musste ein natives Acrylamidgel angefertigt werden, um die Banden besser auftrennen zu können.

Zusammensetzung:

- 10 % Acrylamid
- 1x TBE-Puffer
- 0,07 % APS
- 0,07 % TEMED

Jeweils 10 μ l der Amplifikate wurden mit 2 μ l 6x DNA Loading Dye vermischt und bei 100 V im 1x TBE-Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend in einem Ethidiumbromidbad (0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in 1x TBE) gefärbt und anschließend im UV-Transilluminator abgebildet.

3.10. Transfektion

Zur Regulation der Genexpression wurde siRNA in 2 verschiedene Zelllinien transfeziert. Dafür wurden die Suspensionszelllinien für 2-3 Passagen in RPMI 1640 bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Transfektion wurden 5×10^5 Zellen/Well abzentrifugiert und in Puffer R (Neon Transfection Kit, Life Technologies) resuspendiert. Anschließend wurde die siRNA (2 μ M) zu gegeben und der gesamte Ansatz in einer Neon Transfection 10 μ l Tip aufgenommen. Bei der Elektroporation wurden verschiedene Bedingungen für einen optimalen Transfektionserfolg getestet. Danach wurden das Gemisch in 90 μ l RPMI 1640 aufgenommen (entspricht 200 nM siRNA Endkonzentration) und für 24 Stunden bei 37 °C und CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x in PBS mit 20 U/ml Heparin gewaschen, um evtl. anhaftende siRNA zu reduzieren und anschließend die RNA isoliert und analysiert.

4. Studiensynopse

Tabelle 10: Zusammenfassung der durchgeführten Studie zu EBV-miRNA

Titel	Nachweis von EBV miRNA in humanen Vollblut
Akronym	EBV miRNA
Studiencode Deutsches Register Klinischer Studien	DRKS00010713 (Registrierung der Studie im Mai 2017)
Ethikvotum	3530-08/12 (Positives Votum im August 2012 erhalten) Ursprünglicher Ethikantrag und Änderungen befinden sich im Anhang
Zielgruppe	Stationäre und ambulante Patienten mit Verdacht auf eine EBV-Infektion
Design	Kontrolliert, nicht-randomisiert
Ziele	1. Bestimmung der Expressionsprofile von verschiedenen viralen miRNAs 2. Identifizierung von Marker-miRNAs für die unterschiedlichen Infektionsphasen
Patientenzahl	163 Patienten; 129 auswertbare Proben, 21 % Dropout
Studiengruppen	Erstinfektion (Viruslast positiv; VCA IgM ⁺ /IgG ^{+/-} , EBNA IgM ^{+/-} /IgG ⁻) Reaktivierung (Viruslast positiv; VCA IgM ⁻ /IgG ⁺⁺ ; EBNA IgM ⁻ /IgG ^{+/-}), symptomlose Träger (Viruslast negativ, VCA IgM ⁻ /IgG ⁺ ; EBNA IgM ⁻ /IgG ⁺) seronegative Referenzgruppe (Viruslast negativ, VCA IgM ⁻ /IgG ⁻ ; EBNA IgM ⁻ /IgG ⁻)
Einschlusskriterien	Patienten mit angeforderter Viruslast nach Verdacht auf EBV-Erstinfektionen oder -Reaktivierung
Ausschlusskriterien	EBV-induzierte Tumore, HIV, HCV, HLH, PTLD
Beteiligte Zentren	Universitätsklinikum Jena
Zeitplan	Probensammlung von 09/2012 – 07/2017 Analyse der miRNAs 12/2015 – 08/2017

5. Ergebnisse

5.1. Studienkohorte

5.1.1. Probeneinschluss

Die Akquirierung der EBV-Proben erfolgte am Universitätsklinikum Jena von September 2012 bis Juni 2017 (Abbildung 4). Die Probensammlung erfolgte zunächst nur in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin, von welcher auch der Großteil der Patienten mit Erstinfektionen stammt. Wegen der schleppenden Rekrutierung wurden zusätzlich Patienten der Ambulanz für Knochenmarkstransplantation eingeschlossen, bei welcher im Rahmen der postoperativen Untersuchungen regelmäßig Blutproben entnommen und so viele Patienten mit Reaktivierung und nicht akut erkrankte Träger gesammelt werden konnten. Die restlichen Blutproben stammten von Patienten aus anderen Abteilungen des Klinikums bei denen eine EBV-Viruslastbestimmung durch den behandelnden Arzt angeordnet wurde (Tabelle 11). Bei allen Patienten wurde eine schriftliche Aufklärung eingeholt (Anhang, Seite 88) und einmalig 9 ml EDTA-Vollblut entnommen wurden. Zusätzliche Daten wie Alter, Geschlecht, vorliegende Grunderkrankungen und serologische Vorbefunde wurden ebenfalls dokumentiert (Anhang, Seite 91). Nach der schnellen Akquirierung von Reaktivierungen und gesunden Trägern verzögerte sich der weitere Probeneinschluss, da die Zahl der vom Uniklinikum Jena behandelten EBV-Erstinfektionen sehr gering war und die erforderliche Mindestzahl für eine valide statistische Auswertung erst im Oktober 2016 erreicht werden konnte.

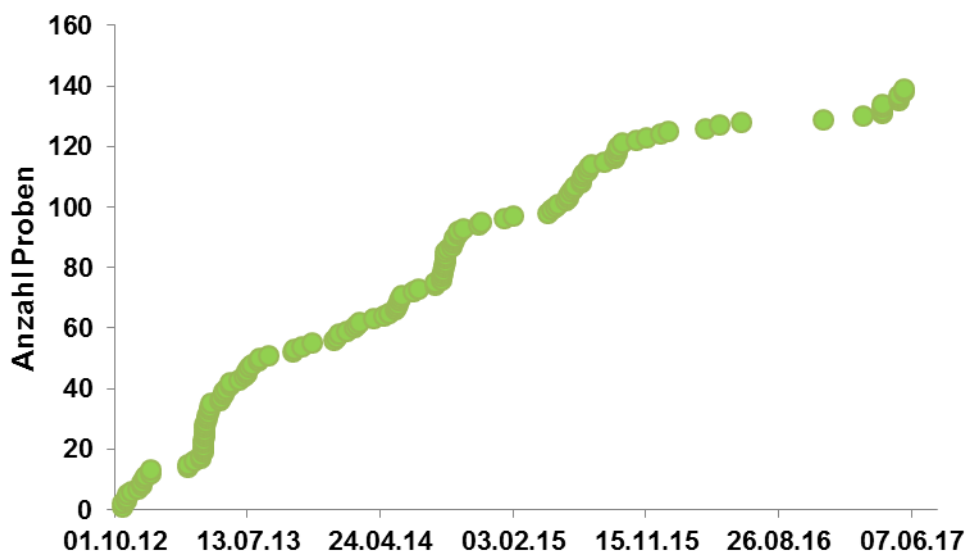


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Probensammlung

Tabelle 11: Herkunft der Studienproben

	Erstinfektion	Reaktivierung	symptomlose Träger	Referenz (seronegativ)
Kinderklinik	28	14	10	3
Transplantationsambulanz	-	17	19	-
Hepatologie/ Infektiologie	5	5	1	-
Kinderchirurgie	-	-	-	10
Hämatologie/ Onkologie	2	3	1	-
Herz-/Thoraxchirurgie	-	2	1	-
Notfallaufnahme	1	2	3	1
andere	1	1	1	-

5.1.2. Allgemeine Daten

In den 5 Jahren der Akquirierung konnten 157 Blutproben gesammelt werden, welche anhand von Serologie (Robertson, Beynon et al. 2003) und Viruslast in 4 verschiedene Studiengruppen eingeordnet wurden (Tabelle 12). Davon konnten 10 Proben nicht eindeutig einer Studiengruppe zugeordnet werden, da die serologischen Daten fehlten. Bei insgesamt 18 Fällen war nicht genügend oder falsches Material vorhanden, so dass am Ende 129 Proben für die Studie ausgewertet werden konnten. Zusätzlich konnten bei den Reaktivierungen 3 weitere Proben gesammelt werden, welche gesondert betrachtet wurden, da es sich dabei um die Sonderfälle einer HLH bzw. PTLD handelte und damit um ein Ausschlusskriterium.

Tabelle 12: Übersicht der eingeschlossenen und analysierten Studienproben

	Erstinfektion	Reaktivierung	Symptomlose Träger	Referenz
Probanden	35	44	36	14
Geschlecht	19/16	31/13	24/12	11/3
m/w	(54/46 %)	(70/30 %)	(67/33 %)	(79/21%)
Definition der Studiengruppe	Viruslast positiv; VCA IgM ⁺ /IgG ^{+/-} EBNA IgM ^{+/-} /IgG ⁻	Viruslast positiv; VCA IgM ⁻ /IgG ⁺⁺ EBNA IgM ⁻ /IgG ^{+/-}	Viruslast negativ, VCA IgM ⁻ /IgG ⁺ EBNA IgM ⁻ /IgG ⁺	Viruslast negativ, VCA IgM ⁻ /IgG ⁻ EBNA IgM ⁻ /IgG ⁻
Viruslasten				
Median	3,3 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁴	0	0
Mittelwert	1 x 10 ⁶	6,1 x 10 ⁴	0	0
(Kopien/ml)				

Die Viruslasten wiesen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Studiengruppen auf (Abbildung 5). Die Proben der symptomlosen Träger und der Referenzgruppe hatten keine nachweisbare Viruslast, da diese Gruppen auch über dieses Merkmal definiert wurden (Tabelle 12). Die Blutproben von Erstinfektionen weisen im Vergleich zu den Reaktivierungen signifikant ($p < 0,001$) höhere Viruslasten auf.

Bei der Betrachtung der Altersstrukturen dieser Kohorte, fiel auf, dass bei den Erstinfektionen der Altersdurchschnitt mit 13 Jahren mit einer relativ schmalen Altersspanne lag, was mit der allgemeinen Prävalenz in Industrieländern übereinstimmt (Balfour, Sifakis et al. 2013). Die symptomlosen Infektionen und Reaktivierungen traten in dieser Kohorte in jedem Alter auf, mit einem Median bei 37 Jahren und einer weiten Altersspanne zwischen 4 bis 81 Jahren. Die untypischen Reaktivierungen im Kindesalter waren teilweise der Tatsache geschuldet, dass in der Kohorte einige Proben von Kindern aus der Transplantationsmedizin eingeschlossen wurden (Abbildung 5).

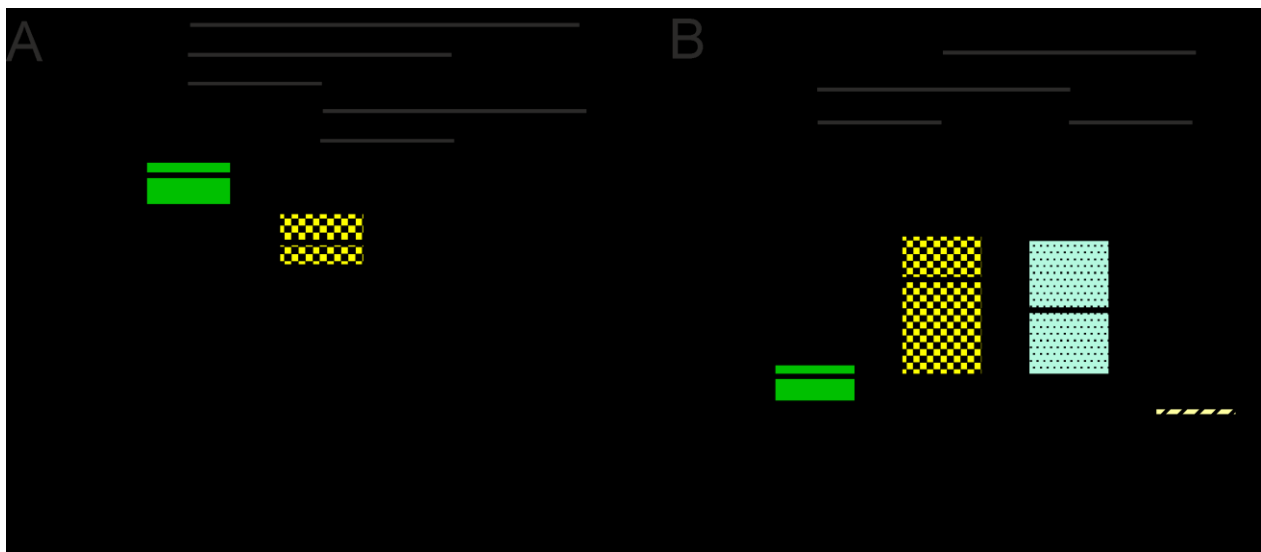


Abbildung 5: Verteilung der allgemeinen Charakteristika über die einzelnen Studiengruppen. Dargestellt sind im Boxplot die Mediane sowie der Bereich zwischen kleinstem und größtem Wert für die Viruslast (A) und das Alter (B). Die Auswertung mittels Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test ergab signifikante Unterschiede zwischen allen Gruppen ($p \leq 0,001$).

5.2. Etablierung einer geeigneten PCR-basierten Nachweismethode

5.2.1. Evaluierung einer effizienten Isolationsmethode für miRNA aus Vollblut

Für die Analyse der Blutproben war es wichtig, miRNA effizient isolieren zu können. Bei der Aufreinigung von RNA gehen kleine RNA-Fractionen oft verloren oder werden nur teilweise mit extrahiert. Deshalb wurden zunächst zwei verschiedene Säulen-basierte Isolationsmethoden (miRNeasy Mini Kit und *mirVana*TM miRNA Isolation Kit) sowie die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) miteinander verglichen (Tabelle 13). Dafür wurde Total-RNA isoliert und dann die miR-16 und miR-BHRF1-1 mittels Loop-qPCR analysiert. Die PCI-Methode lieferte dabei schlechtere Ergebnisse mit C_T-Werten, die 1-2 Zyklen über den kommerziellen Kits lagen. Daraus folgt, dass durch diese Methode kleine RNAs weniger effizient isoliert werden konnten. Die beiden Säulen-Kits lieferten hingegen vergleichbare Ergebnisse, wobei das miRNeasy Mini Kit die höchste Ausbeute zeigte.

Tabelle 13: Vergleich der C_T-Werte von verschiedenen Isolationsmethoden für miRNA. Die Aufreinigung von 2 beispielhaften Vollblut-Proben erfolgte mit dem miRNeasy Mini Kit, *mirVana*TM miRNA Isolation Kit und der PCI-Methode. Die angegebenen Werte stellen die Unterschiede in den erhaltenen C_T-Werten der qPCR im Vergleich zum miRNeasy Kit dar

Probe	C _T -Werte	
	miR-16	miR-BHRF1-1
1 miRNeasy	± 0	± 0
1 mirVana	+1,32	+0,01
1 PCI-Methode	+1,12	+2,04
2 miRNeasy	± 0	± 0
2 mirVana	-0,8	+0,02
2 PCI-Methode	+1,49	+2,14

5.2.2. Validierung der qPCR mit Taqman-Sonden

Für alle bekannten EBV-miRNAs wurden bereits Primer und Sonden publiziert und erfolgreich verwendet (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009). Deshalb sollten auch in dieser Arbeit die erprobten Sequenzen eingesetzt werden. Bei den anfänglichen Validierungen traten jedoch Probleme mit der Spezifität auf. So kam es bei miR-BART5-5p, -6-5p und -7-3p beim Einsatz eines Loop-Primergemisches in der RT zu unspezifischen Signalen in der anschließenden qPCR (Abbildung 6), obwohl aufgereinigte synthetische miRNAs in definierten Konzentrationen eingesetzt wurden. Bei Durchführung einer spezifischen RT mit nur einem RT-Primer traten diese Probleme nicht mehr auf. Dies ist beispielhaft für miR-BART5-5p in Abbildung 6 dargestellt.

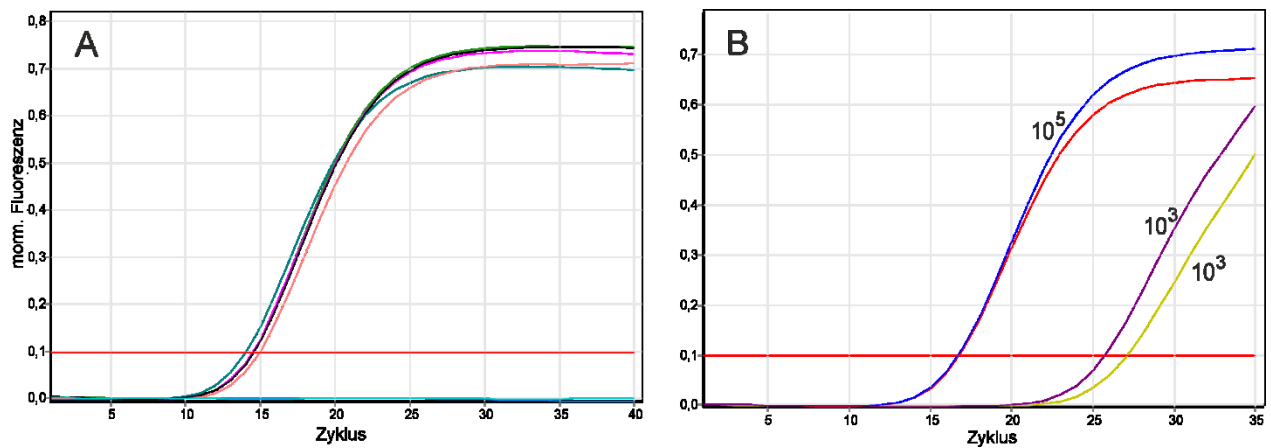


Abbildung 6: Repräsentative Sensorgramme der qPCR-Läufe mit miR-BART5-5p- spezifischen Primern. (A) Verwendung eines RT-Primermixes.(B) Nach RT mit nur 1 bzw. 2 Primern Die rote horizontale Linie definiert den Schwellenwert.

Im weiteren Verlauf der Validierung zeigte sich, dass bei mitgeführten Kontrollen auch ohne Reverse Transkription Signale in der PCR auftraten. Zur Überprüfung der Ursachen wurde der alleinige Loop-Primermix in der PCR getestet. Dabei stellte sich heraus, dass allein der RT-Primer - auch ohne RNA-Signale in der PCR lieferte, welche sich jedoch im Acrylamidgel als unspezifische Autoamplifikation (siehe Diskussion) erwiesen (Abbildung 7). Eine Besserung konnte durch eine Verkürzung des Vorwärtsprimers um 4 Basen am 3' Ende erzielt werden. Die Signale in der PCR wurden deutlich schwächer und im Gel wurde sichtbar, dass ohne miRNA-Matrize kein unspezifisches Amplifikat mehr entstand. Aufgrund dieser Tatsache wurde für alle miRNAs das Primerdesign von Cosmopoulos *et al.* geändert und neue verkürzte Vorwärtsprimer verwendet.

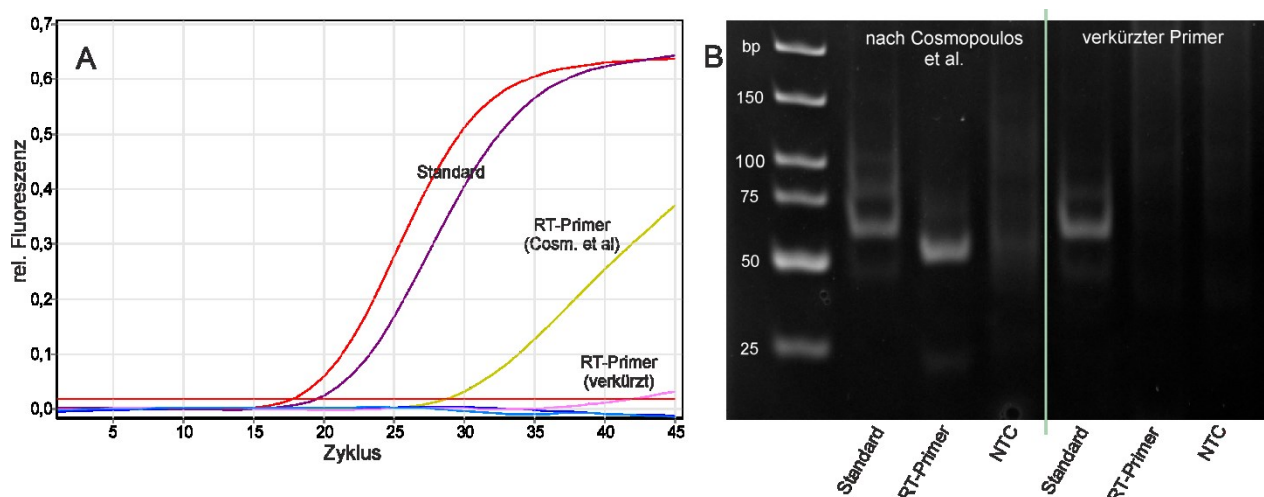


Abbildung 7: Vergleich der PCR-Ergebnisse für miR-BHRF1-1 mit eigenem und publiziertem Primerdesign. (A) Exemplarisches Sensorgramm von Standard- und Kontrollproben, welche nur RT-Primer enthielten. Die waagerechte rote Linie definiert den Schwellenwert. (B) Gelanalyse der Amplifikate aus Bild A.

5.2.3. Validierung des Poly(A)-RT qPCR-Systems

Nachdem sich die Taqman-basierte Methode zum miRNA Nachweis als nicht geeignet erwies, wurde eine SYBR[®] Green-basierte PCR getestet. Verschiedene Hersteller bieten bereits fertige Assays für EBV-miRNAs an, z.B. miScript-PCR-System von Qiagen. Zum Testen wurden die Hersteller-Assays für miR-BART1-5p und -7-3p überprüft. Die miRNAs wurden dabei gleichzeitig polyadenyliert und dann über den mitgelieferten universellen Primer in cDNA umgeschrieben. Die Amplifizierung erfolgte dann mit spezifischen Vorwärtsprimern und die Detektion mittels SYBR[®] Green. Um die Spezifität der Assays zu überprüfen, wurden eine EBV-seronegative Blutprobe sowie eine EBV-negative Zelllinie getestet. Beide wiesen für die ausgewählten miRNAs spezifische Schmelzpeaks bei 76°C auf, obwohl die Proben keine EBV-miRNAs enthielten (Abbildung 8). Der alternative Einsatz von eigenen Vorwärtsprimern erzielte jedoch auch keine höhere Spezifität. Damit erwies sich auch diese Methode als ungeeignet für eine spezifische Detektion von EBV-miRNAs zur Analyse der Blutproben.

5.2.4. Kombination von Loop-RT und SYBR[®] Green-PCR

Im weiteren Verlauf wurde die Reverse Transkription mit geloopten Primern mit der SYBR[®] Green-PCR kombiniert. Dadurch konnten unspezifische Signale in der PCR durch die anschließende Schmelzkurvenanalyse leichter identifiziert werden. So wurden wie zuvor EBV-seronegative Proben getestet, um die Spezifität der Methode zu überprüfen. Durch die Verwendung von spezifischen RT-Primern in Verbindung mit selbstkonstruierten Vorwärtsprimern in der PCR konnten negative Proben über die Schmelzkurvenanalyse eindeutig identifiziert werden (Abbildung 9). Unspezifische Peaks lagen zumeist etwa 2-3°C unter denen der Positivkontrollen und wurden somit eindeutig als negativ gewertet.

Jedoch war die Sensitivität der Methode stark abhängig von der Primerkonzentration in der RT (Abbildung 10). Wenn zu wenig Primer eingesetzt wurde (< 15 nM), verschlechterte sich die Nachweisgrenze in der anschließenden PCR. Bei einer Konzentration von 50 nM RT-Primer konnte eine optimale Sensitivität erreicht werden, ohne dass es – auch bei Verwendung eines Primermixes in der RT zu Störsignalen kam. Für die Analyse der Studienproben wurde deshalb die Kombinationsmethode gewählt.

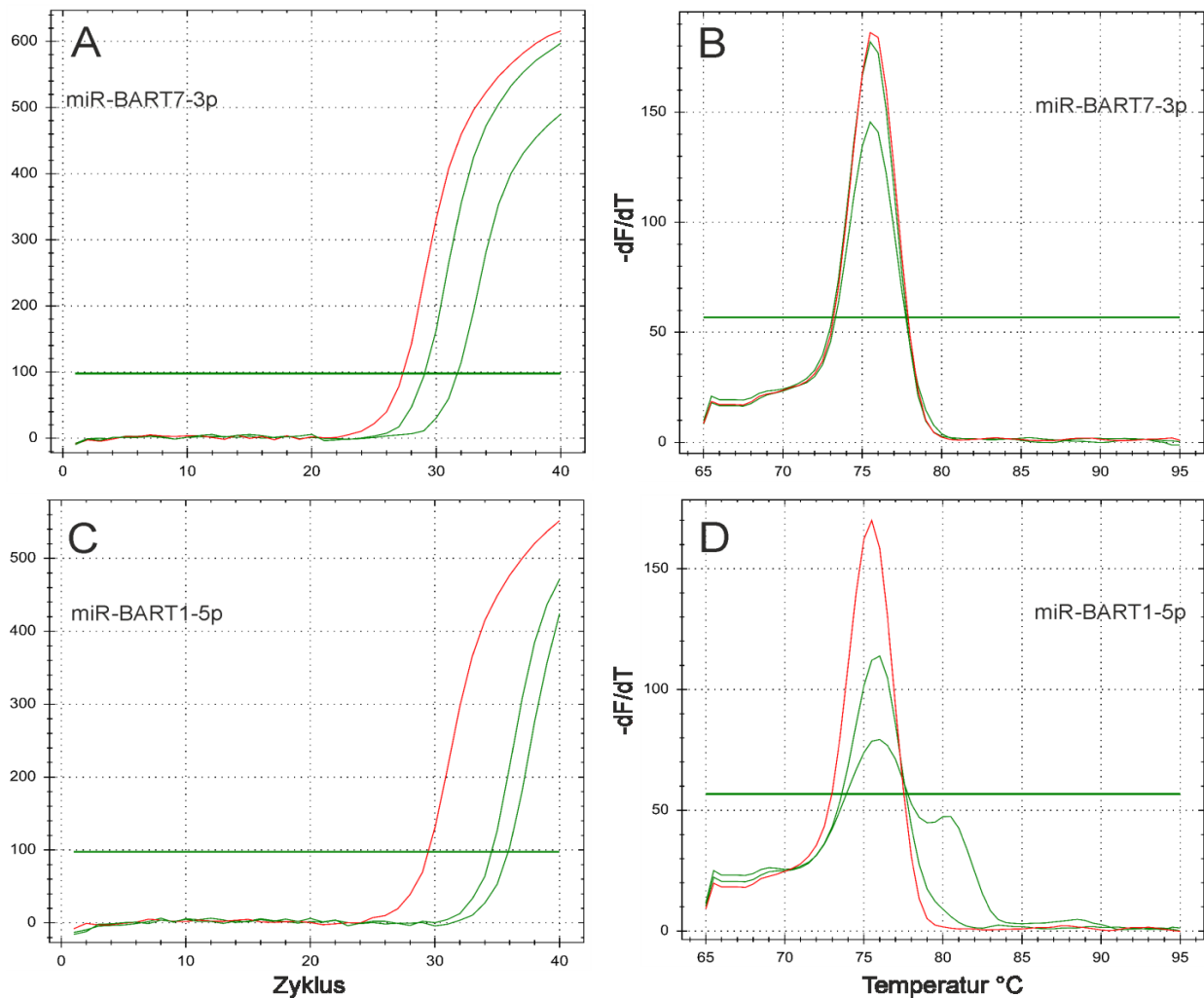


Abbildung 8: qPCR-Ergebnisse für 2 virale miRNAs mit dem miScript-Assay. Für die Testung wurden 3 verschiedene Proben getestet: RNA-Standard (10^5 Moleküle, rot markiert), eine seronegative Blutprobe und eine EBV-negative B-Zelllinie (beide in grün). (A+C) Sensorgramme für miR-BART7-3p und -1-5p. (B+D) Schmelzpunktanalysen der Proben. Die waagerechte grüne Linie definiert den Schwellenwert.

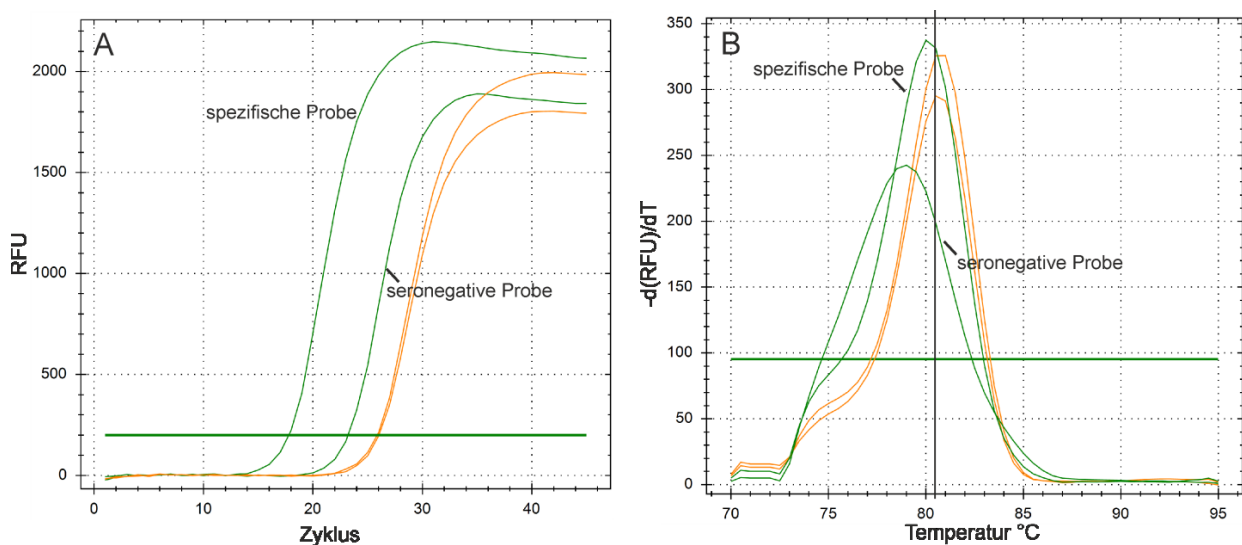


Abbildung 9: Analyse der qPCR-Spezifität mit miR-BART7-3p spezifischen RT-Primern. Dargestellt sind (A) Sensorgramm und (B) Schmelzkurvenanalysen von einer Erstinfektion als spezifische Probe, einer serogenativen Probe sowie den Positivkontrollen (orange).

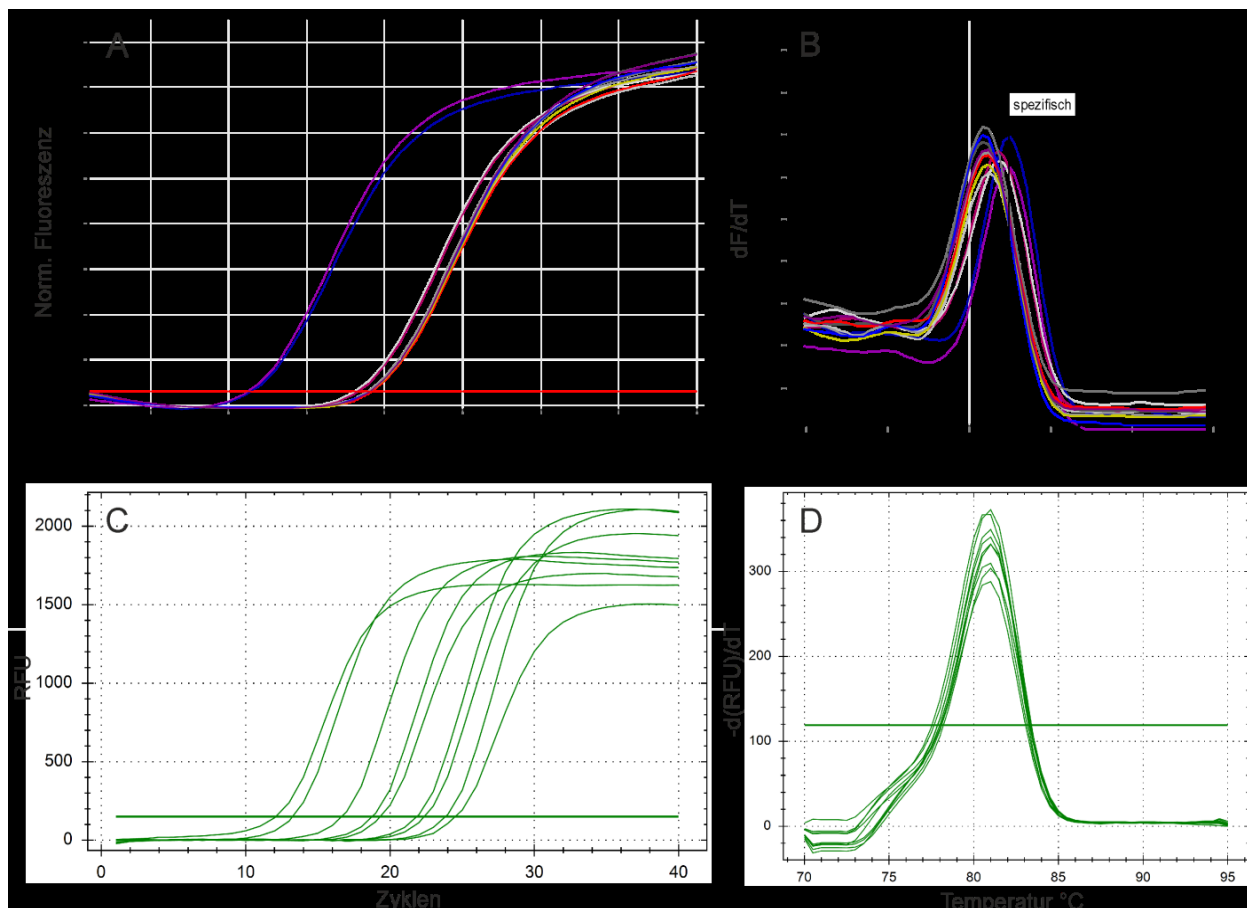


Abbildung 10: Einfluss der Loop-Primerkonzentrationen auf die Sensitivität der qPCR. Exemplarische Ergebnisse der Standardkurve von miR-BART7-3p mit 12,5 nM Loop-Primer in der RT (A+B) bzw. 50 nM Loop-Primer (C+D). Getestet wurde ein Konzentrationsbereich von 10^6 bis 10^2 Moleküle.

5.2.5. Verwendung einer Präamplifikation zur Signalverstärkung

Bei der anfänglichen Probenanalyse zeigte sich, dass kaum miRNAs detektiert werden konnten oder viele Doppelpeaks in der Schmelzkurve auftraten. Deshalb wurde eine zusätzliche Präamplifikation getestet, welche die Ausgangsmolekülzahlen für die eigentliche Amplifikation erhöhen sollte. Beim Vergleich der PCR-Signale von Patientenproben mit und ohne Präamplifikation zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Sensitivität. Zudem konnten durch die Erhöhung der Ausgangsmoleküle auch unspezifische Signale und Doppelpeaks weiter reduziert werden (Abbildung 11).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die miRNAs für alle Studienproben mit einer Kombination aus Reverser Transkription mit geloopen Primern, Präamplifikation und SYBR® Green-PCR mit Schmelzkurvenanalyse quantifiziert.

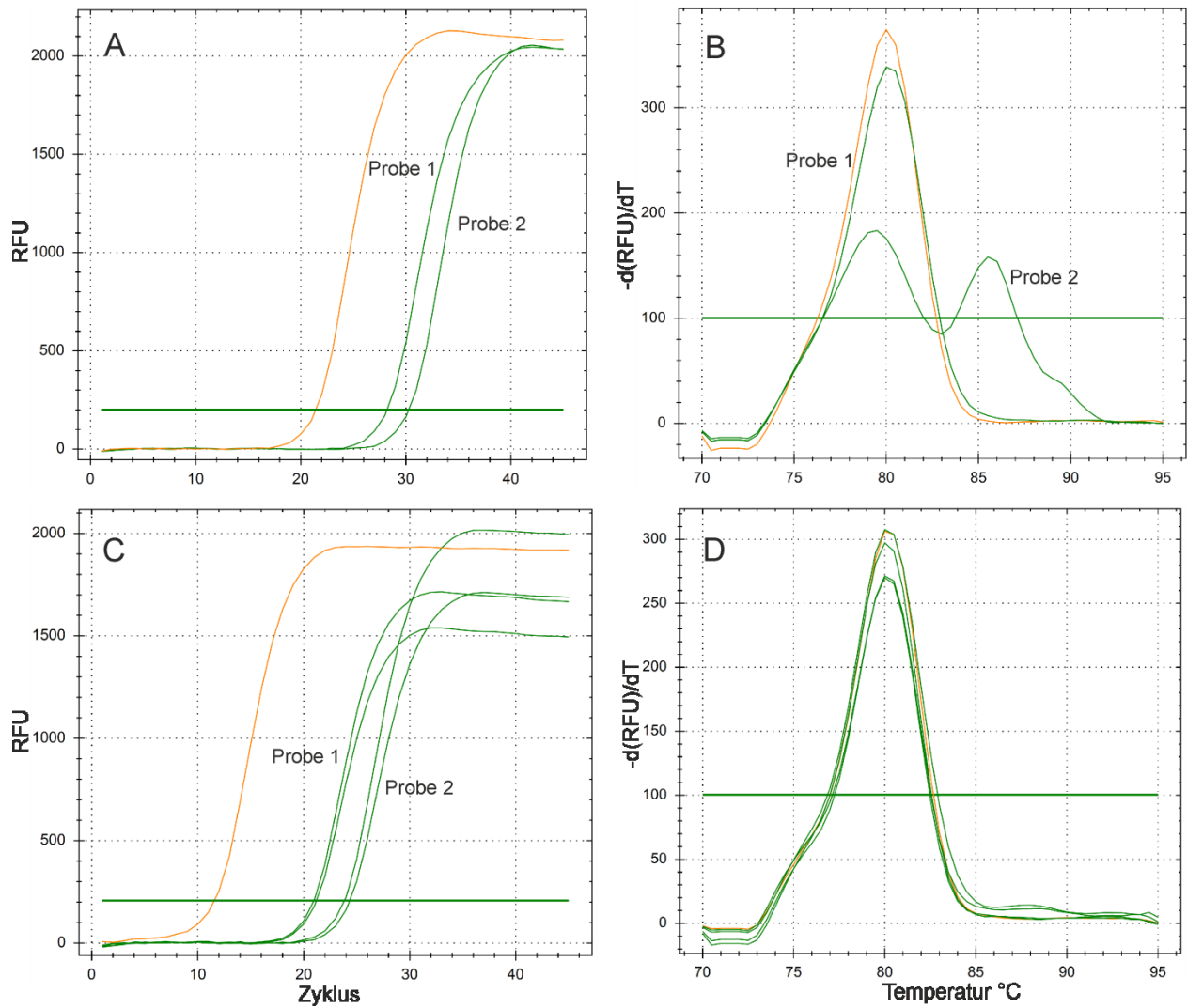


Abbildung 11: Einfluss der Präamplifikation auf die Sensitivität der qPCR. Dargestellt sind die Sensorgramme und Schmelzpunktanalysen von einer Positivkontrolle (orange) und 2 Patientenproben. (A+B) ohne Präamplifikation, (C+D) mit Präamplifikation vor der qPCR.

5.3. Quantifizierung der miRNA aus Patientenproben

5.3.1. Expressionsmuster der verschiedenen miRNAs

Bei den Erstinfektionen wurden allgemein mehr Proben als positiv detektiert. So konnten miR-BART1-5p, 5-5p und 9-3p in 85-95 % der Proben nachgewiesen werden, gefolgt von miR-BART7-3p (75 %), miR-BHRF1-1 (57 %) und BART6-5p (54 %) (Abbildung 12). Bei den Reaktivierungen und symptomlosen Trägern konnten weniger positive PCR-Signale detektiert werden, wobei miR-BART5-5p in mindestens 70 % der Proben nachgewiesen wurde. Mir-BART15-3p hingegen konnte in den beiden Gruppen jeweils nur einmal detektiert werden. Positive Signale für miR-BART9-3p traten in fast allen Proben auf (> 80 %), auch in der seronegativen Gruppe. Die miRNAs BHRF1-2, BART13-3p und 20-5p konnten in keiner einzigen Probe detektiert werden.

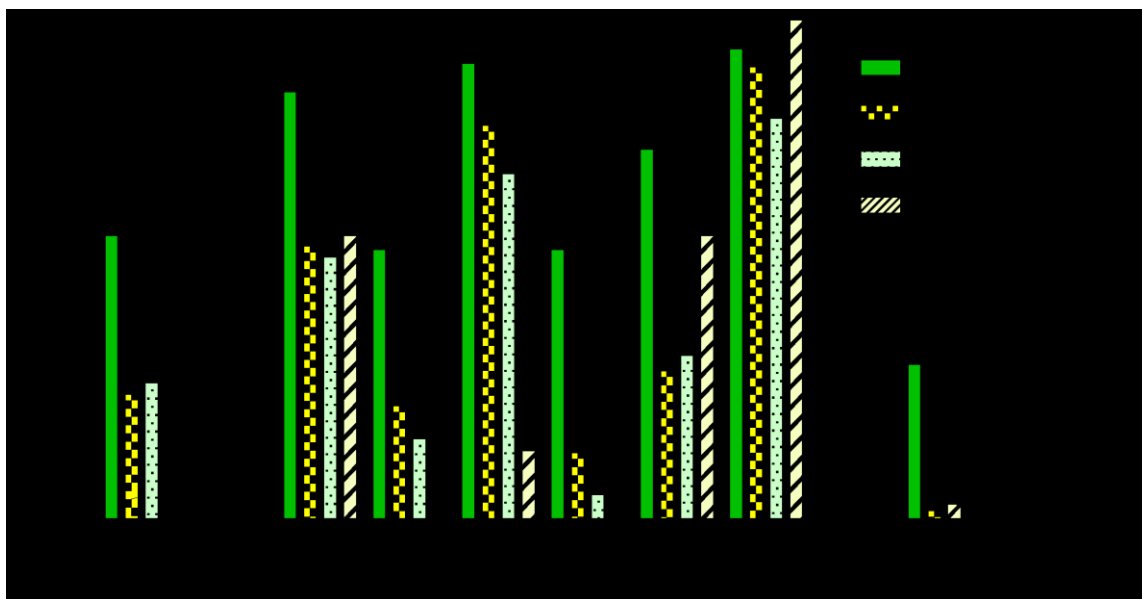


Abbildung 12: Anzahl der positiv detektierten Proben für die einzelnen EBV-miRNAs.

Die absoluten Kopienzahlen waren bei allen untersuchten EBV-miRNAs signifikant höher während einer Erstinfektion im Vergleich zur Reaktivierung (mit Ausnahme von miR-BART9-3p) oder den anderen beiden Studiengruppen (Abbildung 13). Innerhalb der seronegativen Gruppe traten starke Signale für miR-BART9-3p, aber auch für 1-5p, 7-3p und 5-5p auf, was auf unspezifische Signale in der PCR schließen lässt.

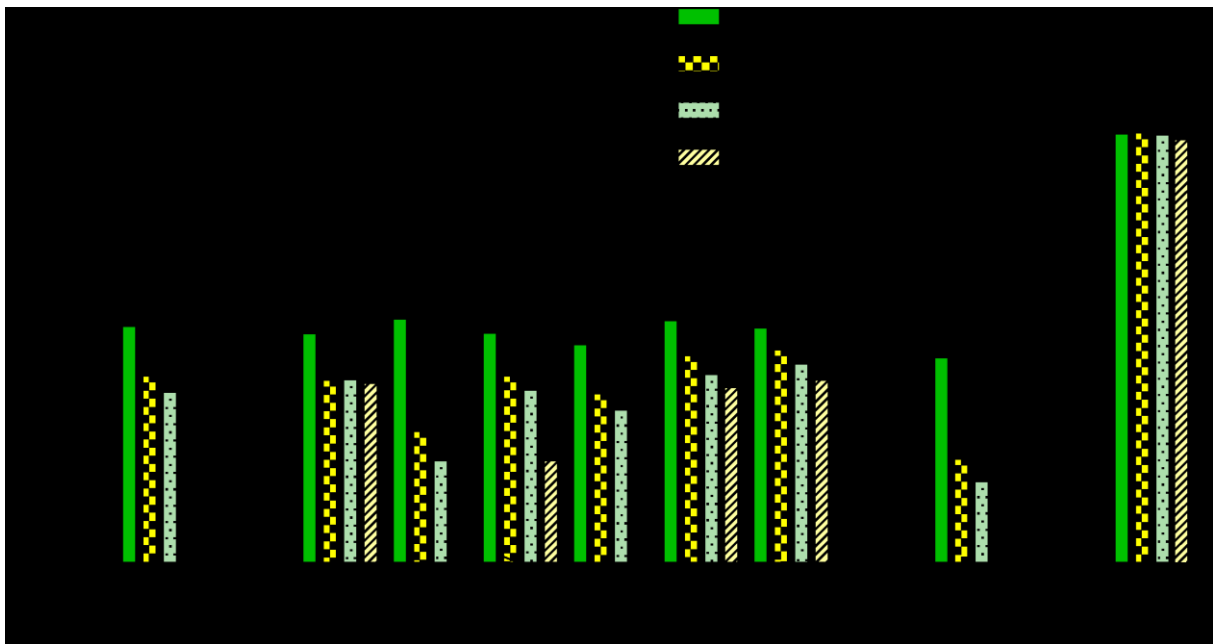


Abbildung 13: Absolute Expression der viralen miRNAs im Vollblut. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Mann-Whitney U-Test (95 % Konfidenzintervall). miR-BHRF1-2, -BART13-3p und -20-5p konnten nicht detektiert (n.d.) werden.

Deshalb wurden dann zur besseren Darstellung der Expressionsunterschiede und um diese Schwankungen innerhalb der Nachweismethode auszugleichen, die EBV-miRNA auf die humane miR-16 relativiert (Abbildung 14). Dadurch wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher, wobei sich die Signifikanzen zwischen den Gruppen kaum änderten.

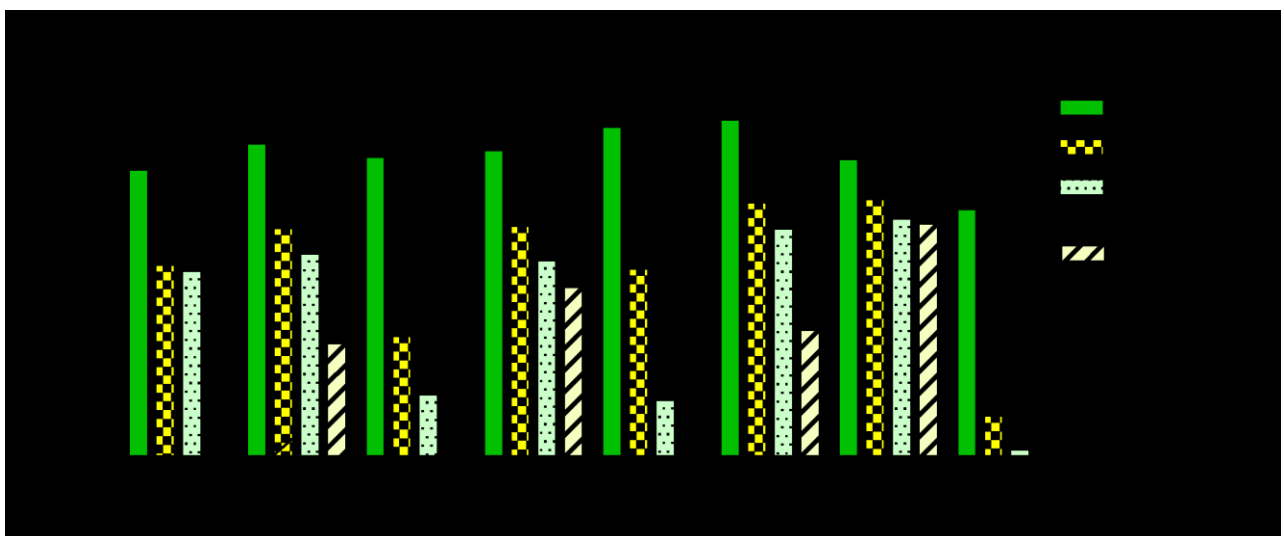


Abbildung 14: Expression im Vergleich zur humanen miR-16. Die Werte wurden über die Standardmethode $2^{\Delta Ct}$ ermittelt. Signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede wurden über einen Mann-Whitney U-Test berechnet.

Um mögliche falsch-positive Ergebnisse besser kompensieren zu können, wurden die Signale zusätzlich auf die Referenzgruppe von 14 seronegativen Patienten normalisiert. Dadurch zeigte sich, dass miR-BHRF1-1 in allen Gruppen die am höchsten exprimierte miRNA war (Abbildung 15). Die Expressionslevel der BART-miRNAs waren sehr variabel, zeigten aber immer die stärkste Expression bei einer Erstinfektion und die geringste während der Latenz (symptomlose Träger). Signifikanzen traten hauptsächlich im Vergleich zur Gruppe der Erstinfektionen auf. Dabei ergaben sich die stärksten Expressionsunterschiede zwischen Erstinfektion und symptomlosen Trägern bei miR-BART15-3p und 2-5p mit 5 log-Stufen Differenz. Der kleinste Unterschied wurde bei miR-BART9-3p (2 log-Stufen) gefunden. Ein signifikanter Unterschied von Reaktivierung und symptomlosen Trägern war nur für miR-BART5-5p beobachtbar, obwohl die Expression nur um 1 log-Stufe erhöht war.

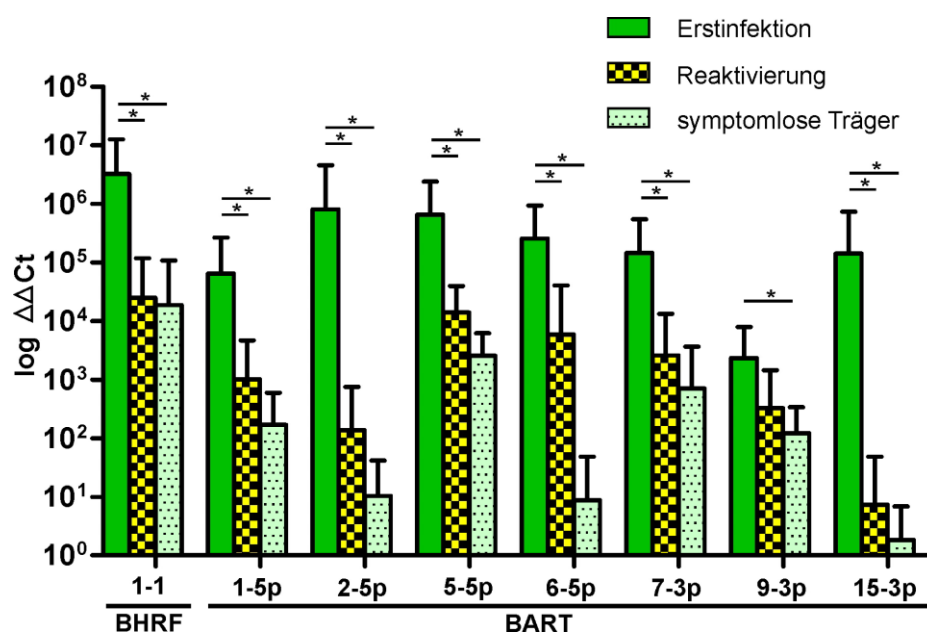


Abbildung 15: Relative Expressionsunterschiede der einzelnen miRNAs. Relative Werte wurden nach der Effizienz-korrigierten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode berechnet mit der humanen miR-16 als Referenz. Alle Werte wurden anschließend noch auf die Gruppe der seronegativen Patienten normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte über einen Mann-Whitney U-Test ($p < 0,05$).

5.3.2. Koexpression

Anschließend wurde untersucht, ob verschiedene miRNAs miteinander korrelieren, also bevorzugt zusammen exprimiert werden. Gekoppelte Expression trat in dieser Studie vor allem bei Erstinfektionen auf. So wurde in 90 % der Proben mit einer nachweisbaren miR-

BART7-3p auch miR-BART1-5p detektiert. Eine gute Korrelation zeigte sich auch zwischen miR-BART1-5p und -5-5p (etwa 89 %) und entsprechend auch zwischen miR-BART7-3p und -5-5p mit etwa 79 % (Tabelle 14A). Zudem korrelierte auch die miR-BART6-5p mit der Expression von 3 anderen miRNAs (60-77 %), aber auch mit miR-BART2-5p (82 %). Die gekoppelte Expression von miR-BART1-5p und -7-3p war auch innerhalb der Reaktivierungen sichtbar mit 68 % (Tabelle 14B). Mit der Viruslast korrelierten nur die miR-BHRF1-1 und -7-3p bei einer Erstinfektion.

Tabelle 14: Korrelationskoeffizienten innerhalb der einzelnen Studiengruppen. Die Bestimmung der Koeffizienten r_s wurde mittels Spearman-Test auf Grundlage der relativen Expressionswerte für die Erstinfektion (A), Reaktivierung (B) und gesunde Träger (C) durchgeführt. Alle Korrelationen über 50 % wurden als gekoppelte Expression bewertet und sind in der Tabelle abstufend rot markiert.

A	Viruslast	BHRF1-	BART1-	BART2-	BART5-	BART6-	BART7-	BART9-
BHRF1-1	0,670							
BART1-5p	0,370	0,533						
BART2-5p	0,205	0,398	0,726					
BART5-5p	0,353	0,599	0,890	0,584				
BART6-5p	0,226	0,372	0,752	0,824	0,600			
BART7-3p	0,516	0,599	0,902	0,691	0,785	0,766		
BART9-3p	0,204	0,232	0,684	0,463	0,734	0,495	0,554	
BART15-3p	0,444	0,380	0,684	0,511	0,657	0,741	0,688	0,606

B	Viruslast	BHRF1-	BART1-	BART2-	BART5-	BART6-	BART7-	BART9-
BHRF1-1	0,120							
BART1-5p	0,041	0,400						
BART2-5p	0,108	0,283	0,606					
BART5-5p	-0,160	0,160	0,668	0,326				
BART6-5p	0,031	0,286	0,505	0,671	0,346			
BART7-3p	0,130	0,426	0,675	0,538	0,414	0,595		
BART9-3p	0,128	-0,358	-0,054	-0,086	0,289	0,061	-0,054	
BART15-3p	0,174	0,324	0,260	0,302	0,250	0,392	0,229	-0,037

C	Viruslast	BHRF1-	BART1-	BART2-	BART5-	BART6-	BART7-	BART9-
BHRF1-1	-0,103							
BART1-5p	-0,163	0,580						
BART2-5p	-0,050	0,157	0,259					
BART5-5p	-0,214	0,055	0,322	0,066				
BART6-5p	-0,041	-0,148	0,196	0,233	0,139			
BART7-3p	-0,116	0,438	0,382	0,246	-0,212	0,169		
BART9-3p	-0,090	-0,297	-0,037	-0,158	0,179	-0,068	-0,279	
BART15-3p	-0,029	-0,103	0,112	0,363	0,041	0,717	0,339	-0,269

5.3.3. Uncharakterisierte Proben

Innerhalb der Studie wurde n=7 Proben asserviert, welche aufgrund von Serologie und Viruslast nicht eindeutig in einer der drei prädefinierten Phänotypen zugeordnet werden konnten (Tabelle 15). Die betreffenden Proben wiesen alle eine positive Viruslast auf; es fehlten jedoch die serologischen Befunde. Für die Bestimmung der Infektionsphase wurden die Expressionsprofile dieser Proben mit den Mittelwerten der einzelnen miRNAs von den Erstinfektionen und Reaktivierungen verglichen. Zwei der unbekannten Proben wiesen eine hohe miR-BHRF1-1-Expression auf, wobei nur Probe 2 bei den BART-miRNAs ein für eine Erstinfektionen typisches Profil aufwies (Abbildung 16A). Der ersten Probe hingegen fehlten jegliche miRNAs des BART-Clusters im PCR-Profil. Der Vergleich von 5 weiteren unbekannten Proben zeigten ein stark verändertes Expressionsprofil (Abbildung 16). Bei diesen Probanden lag deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Erstinfektion vor. Eine eindeutige Zuordnung zu der Gruppe der Reaktivierungen war allerdings auch nicht möglich.

Tabelle 15: Übersicht der nicht zuordenbaren Patienten

Probe	Alter	Geschlecht	Aufnahmegrund	Stationärer Hintergrund
1	12	m	ambulant	-
2	15	w	EBV-Tonsillitis	Hepatosplenomegalie, Atemnot
3	15	m	ambulant	-
4	14	w	ambulant	-
5	5	w	ambulant	Li-Fraumeni-Syndrom
6	5	m	ambulant	Kontrolle nach Nephroblastom
7	15	w	ambulant	Kontrolle nach EBV-Infektion

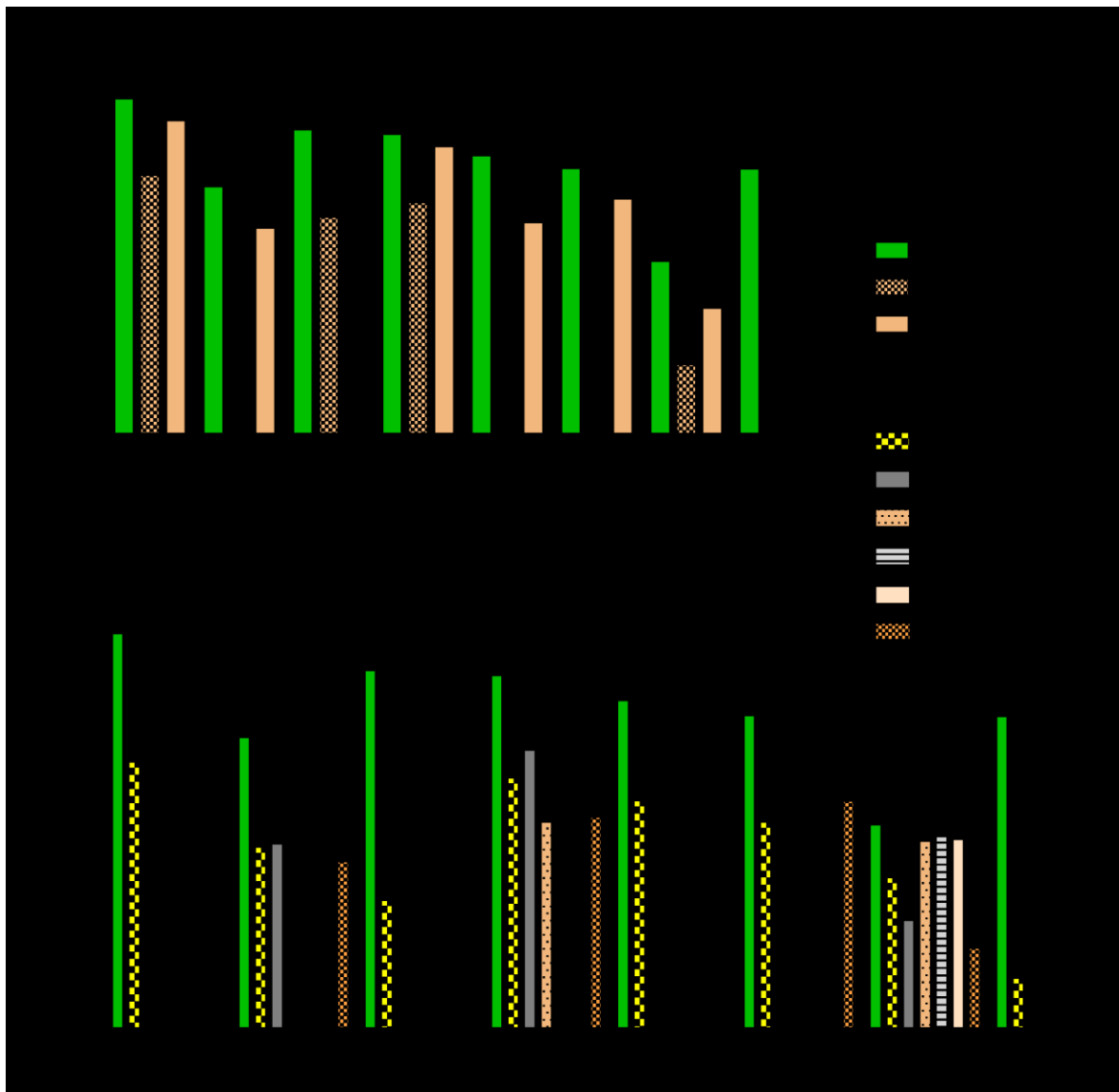


Abbildung 16: Charakterisierung von Proben mit unbekannter Studiengruppe anhand des miRNA-Profils. Alle hier aufgeführten Proben wiesen eine positive Viruslast auf, konnten jedoch durch eine fehlende Serologie nicht eindeutig in eine Studiengruppe zugeordnet werden. (A) Zwei unbekannte Proben mit hoher miR-BHRF1-1-Expression wurden mit dem Expressionsmuster der Erstinfektionen verglichen. (B) Die restlichen 5 Proben besaßen keinerlei nachweisbare miR-BHRF1-1 und wurden deshalb zusätzlich zum Profil der Reaktivierungen verglichen.

5.3.4. Sinkende miRNA-Expression im Verlauf einer Erstinfektionen

Anhand einer Leber-transplantierten Patientin, welche post-operativ regelmäßig untersucht wurde, konnte die Veränderung der miRNA-Expression während der Erstinfektion analysiert werden (Abbildung 17). Dabei fiel auf, dass alle untersuchten miRNAs mit der Zeit stark abfielen und bereits 4 Tage nach der Diagnose kaum noch EBV-miRNAs nachweisbar waren.

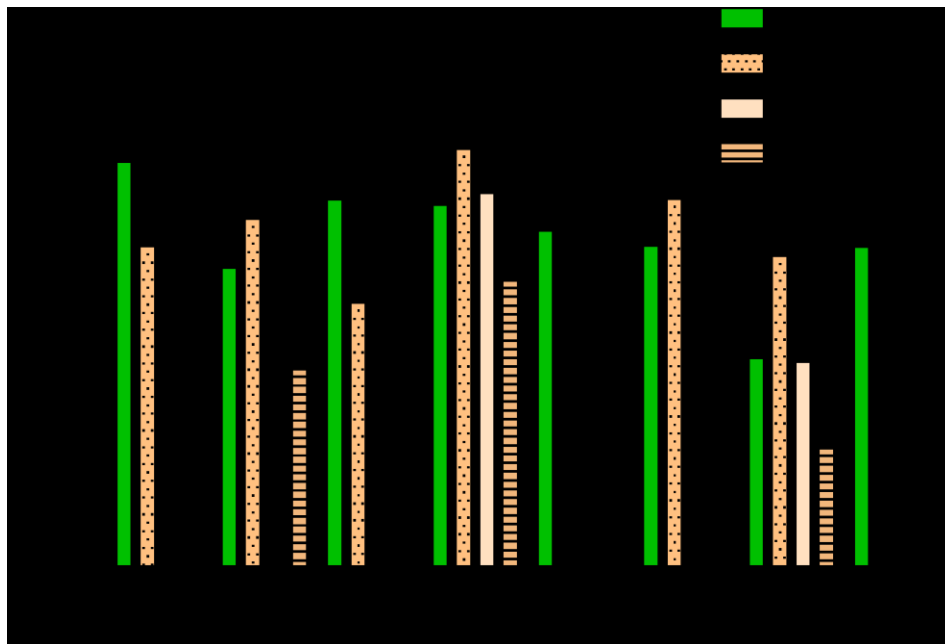


Abbildung 17: Vergleich des zeitlichen Verlaufs einer Erstinfektion mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil in dieser Gruppe. Einer Patientin wurde im Rahmen der Studie kurz nach Auftreten der ersten Symptome (Tag 0), 4 Tage später und nochmals nach 12 Tagen Blut entnommen und die miRNA-Expression an den unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. MiRNAs, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden mit nd (= nicht detektiert) gekennzeichnet.

5.3.5. Lymphoproliferative Erkrankungen

Die miRNA-Profile von einem HLH-Patienten und zwei PTLD-Patienten wurden aufgrund des Studiendesigns aus der eigentlichen Analyse herausgenommen und gesondert untersucht. Die HLH wies eine hohe Expression von miR-BHRF1-1, BART5-5p und 1-5p auf; vergleichbar mit den Expressionsleveln bei einer Reaktivierung. BART2-5p hingegen wird deutlich schwächer exprimiert und BART6-5p, 7-3p und 15-3p fehlten ganz (Abbildung 18).

Die beiden PTLD-Fälle zeigen sehr unterschiedliche Expressionsmuster mit nur sehr wenig detektierbaren EBV-miRNAs. So fehlen miR-BHRF1-1, BART2-5p, 6-5p und 15-3p komplett in beiden Fällen (Abbildung 18). Die Expressionslevel der detektierten miRNAs sind vergleichbar mit denen einer Reaktivierung.

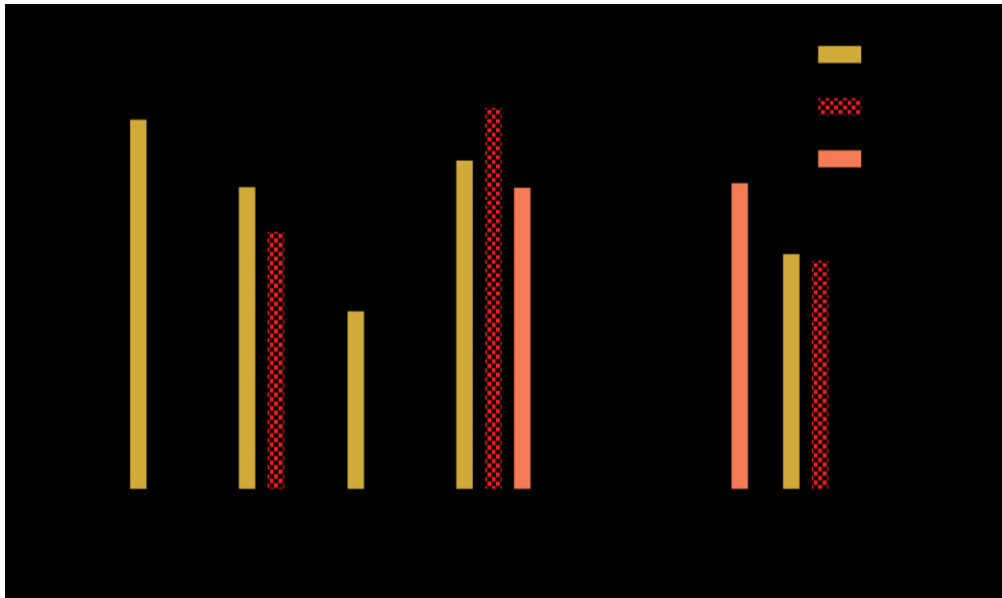


Abbildung 18: EBV-miRNA Expressionsprofile für zwei verschiedene lymphoproliferative Erkrankungen. Untersucht wurden die Proben von einer EBV-induzierten HLH und von zwei EBV-induzierten PTLD-Fällen.

5.4. Gene silencing mittels siRNA

In Vorversuchen wurde die Übertragung von siRNA in B-Zellen mit Hilfe von Chemie-basierten Kits getestet. Jedoch konnte mit keinem Reagenz eine erfolgreiche Transfektion in B-Zellen erzielt werden. Infolgedessen wurde siRNA mit Hilfe von Elektroporation in 2 verschiedene Zelllinien transfiziert. Zunächst wurde die Effektivität der Methode mit dem Neon Transfection System anhand von GAPDH-siRNA überprüft. Dabei konnte eine signifikante Hemmung der GAPDH-mRNA in beiden B-Zelllinien erzielt werden (Abbildung 19). Als Kontrolle wurde eine Elektroporation ohne siRNA bzw. mit unspezifischer siRNA mitgeführt.

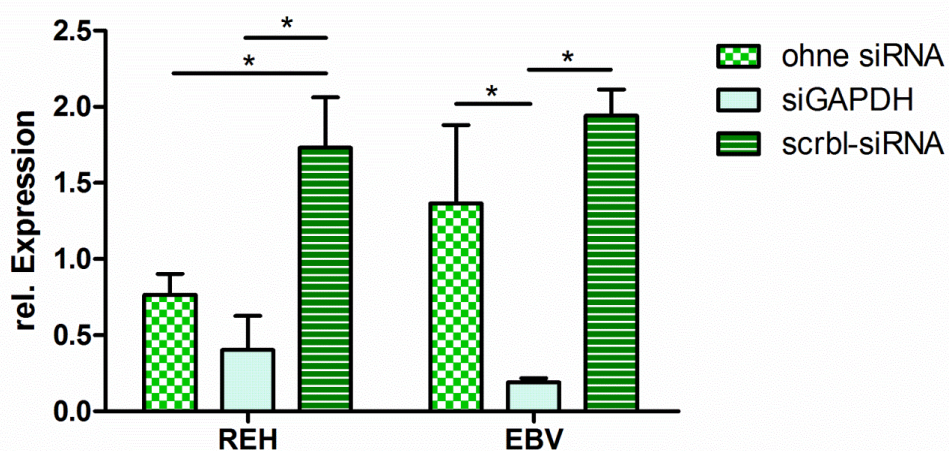


Abbildung 19: GAPDH-Expression nach Transfektion mit siRNA. Der Effekt von GAPDH-siRNA wurde durch Elektroporation bei 1800 V für 10 ms in verschiedenen Zellen getestet: eine EBV-infizierte und eine ursprüngliche B-Zelllinie. Als Kontrolle diente eine unspezifische siRNA (scrbl) und eine Leertransfektion ohne siRNA. Die Auswertung erfolgte nach 24 h. Als interne Referenz diente β -Actin mRNA. Die Expression wurde relativ zur Kontrolle ohne Elektroporation dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p < 0,05$)

Im weiteren Verlauf wurde dann „intelligente“ siRNA in die Zelllinien übertragen. Diese besitzt am 3' Ende ein Peptid und wird erst durch dessen Abspaltung aktiviert. Zur Kontrolle wurden eine siRNA ohne Peptid sowie die unspezifisches RNA-Oligo (scrbl-siRNA) mitgetestet. Dabei konnte eine Reduzierung der Expression von AGAP1 bei normaler siRNA in beiden Zellarten ermittelt werden. Die Peptid-gekoppelte siRNA hingegen zeigte kaum einen Effekt (Abbildung 20). Allerdings waren die Unterschiede in der AGAP-Expression im Vergleich zum Kontrollansatz ohne siRNA in beiden Zellarten signifikant ($p > 0,05$). Deshalb wurden anschließend nochmals die Parameter der Elektroporation überprüft, um das Protokoll zu optimieren. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich die Menge der zellulären siRNA ermittelt. Dafür wurde die transfizierte siRNA mittels Loop-qPCR nachgewiesen. Die Daten wurden auf

die stabile zelluläre miR-16 normalisiert. Wie der Abbildung 21 zu entnehmen ist, lieferte eine Reduzierung der elektrischen Spannung von 1800 V auf 1600 V mit gleichzeitiger Verlängerung der Pulsdauer von 10 ms auf 20 ms deutlich bessere Transfektionseffizienzen.

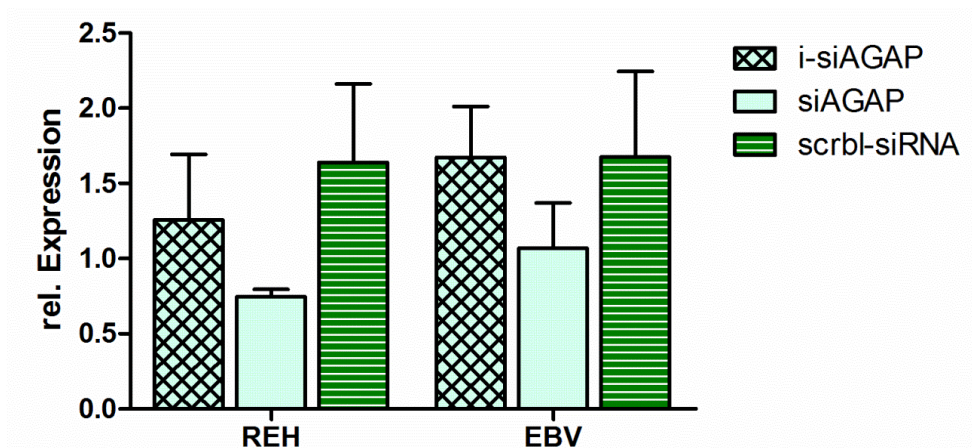


Abbildung 20: AGAP-Expression nach siRNA-Transfektion. In der Elektroporation bei 1800 V für 10 ms wurden verschiedene siRNAs („intelligente“ AGAP-siRNA, normale AGAP-siRNA und eine unspezifische siRNA) übertragen. Als endogene Referenz diente die humane 18s-mRNA. Die Daten wurden auf eine Kontrolle ohne Elektroporation normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte über einen U-Test (95 % Konfidenzintervall).

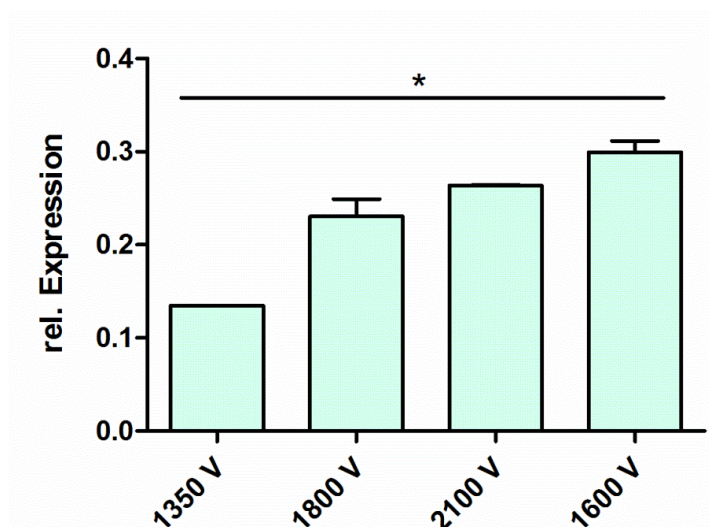


Abbildung 21: Zelluläre siRNA-Menge in Abhängigkeit von den Elektroporationsbedingungen. Nachgewiesen wurde die AGAP-siRNA mittels Loop-qPCR 24 h nach der Transfektion. Als endogene Referenz diente die miRNA miR-16. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen allen Bedingungen (Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test, $p < 0,05$).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde erneut eine Transfektion mit „intelligenter“ siRNA in EBV-infizierte B-Zellen durchgeführt; diesmal jedoch bei nur 1600 V. Es war ein deutlicher *Silencing*-Effekt bei normaler AGAP-siRNA zu sehen. Die Peptid-gekoppelte siRNA hingegen wies eine signifikant höhere Expression auf ($p < 0,05$), vergleichbar mit

dem AGAP-Level bei der Kontrolle ohne siRNA (Abbildung 22). Gleichzeitig wurde eine GAPDH-siRNA übertragen, wobei die Expression im Vergleich zu AGAP- und ohne siRNA signifikant reduziert werden konnte (Abbildung 25, Anhang). Das Elektroporationsprotokoll war somit optimal, um die RNA-Oligonukleotide effizient in die B-Zellen übertragen zu können. Die Aktivierung der intelligente siRNA blieb jedoch aus.

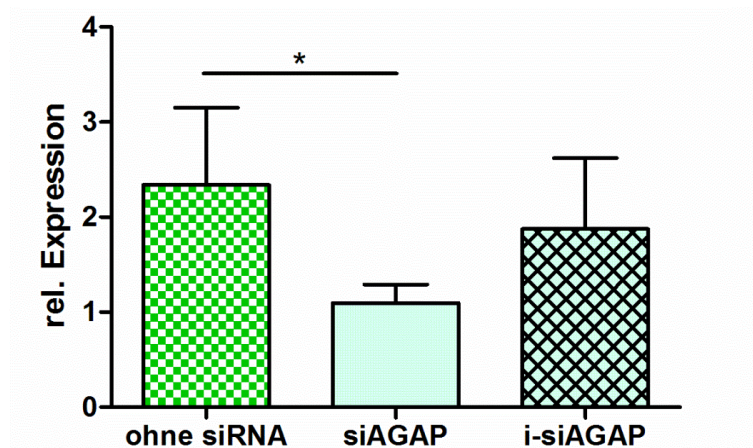


Abbildung 22: AGAP-Expression nach siRNA-Transfektion. In der Elektroporation bei 1600 V für 20 ms wurden verschiedene siRNAs übertragen. Als endogene Referenz diente 18s RNA. Die Daten wurden auf eine Kontrolle ohne Elektroporation normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte über einen t-Test (Mann-Whitney, 95 % Konfidenzintervall).

6. Diskussion

6.1. Probenakquise und Repräsentativität der Kohorte

Obwohl EBV eines der häufigsten Viren weltweit ist, war die Rekrutierung von Patienten mit akuten EBV-Infektionen oder Reaktivierungen langwierig, da diese symptomlos oder nur als leichter grippaler Infekt verlaufen und die Betroffenen keine ärztliche Behandlung benötigen. Besonders aufwendig war die Rekrutierung von Patienten mit einer Erstinfektion, die in der Regel durch Hausärzte diagnostiziert werden und bei denen nur selten ein stationärer Krankenhausaufenthalt nötig ist. Auf Grund dessen dauerte die Probensammlung der Studie über 5 Jahre.

Bei den meisten Patienten mit Reaktivierung und symptomloser Trägerschaft handelt es sich in dieser Studie um Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation, die somit nicht repräsentativ für die Bevölkerung sind. Die daraus resultierenden Daten für die viralen miRNAs könnten durch die Grunderkrankung der Patienten zu einer Verfälschung der Expressionsprofile geführt haben.

Es konnten anfangs nur fünf seronegative Personen rekrutiert werden. Eine Aufstockung dieser Studiengruppe konnte durch die Erweiterung der Probensammlung in der Kinderchirurgie auf 14 Patienten erzielt werden. Eine äquivalente Probandengröße war jedoch aufgrund der hohen Prävalenz von EBV unter diesem Studiendesign nicht möglich bzw. hätte die Probenakquise deutlich verlängert. Eine Alternative wäre die Rekrutierung von Erstsemesterstudenten, wie das von Balfour *et al.* durchgeführt wurde (Balfour, Odumade et al. 2013). Bei dieser Studie konnten 202 seronegative Probanden von insgesamt 546 Probanden (37 %) eingeschlossen werden. Das hätte aber bei einer routinemäßigen EBV-Diagnostik (Serotypisierung und Viruslastbestimmung) der großen Probenanzahl das Studienbudget überschritten und war damit nicht realisierbar.

6.2. Herausforderungen und Stolpersteine beim Quantifizieren der miRNA

6.2.1. Poly(A)-PCR

Bei der quantitativen Poly(A)-PCR wird die miRNA mit mehreren Adeninresten verlängert, welche als Matrize für den Primer in der anschließenden Reversen Transkription dienen (Kang, Zhang et al. 2012). Für die Analyse der Studienproben wurde ein kommerzielles Kit von Qiagen getestet. Hier kommt ein universeller RT-Primer zum Einsatz, so dass alle miRNAs gleichzeitig in cDNA umgeschrieben werden (Abbildung 23), was mit einer deutlichen Kosteneinsparung verbunden ist, da nicht für jede miRNA eine eigene RT-Reaktion durchgeführt werden muss. Ein großer Nachteil ist jedoch der Verlust der Spezifität. Die Poly(A)-Polymerase unterscheidet laut Hersteller nicht zwischen pre-miRNA, miRNA oder anderen nicht-kodierenden RNAs und auch nicht zwischen humaner oder viraler miRNA. Der Nachweis einer bestimmten miRNA beruht damit allein auf der Spezifität des Vorwärtsprimers in der PCR.

Der Versuch, miR-BART-1-5p und -7-3p aus Patientenblut nachzuweisen, scheiterte. Anfängliche Versuche lieferten gute Ergebnisse, allerdings wurden Signale aus einer EBV-seronegative Blutprobe und der EBV-negative B-Zelllinie detektiert, welche identische Schmelzkurven lieferten, wie die vermeidlich spezifischen Amplifikate. Ursache dafür wäre wahrscheinlich hohe Sequenzähnlichkeiten zwischen humaner und viraler miRNA. Damit war es unmöglich, die unspezifischen PCR-Produkte von den beiden ausgewählten miRNAs zu differenzieren. Weder Veränderungen der *Annealing*-Temperatur noch der Einsatz eines anderen Vorwärtsprimers konnten diese unspezifischen Signale eliminieren. Damit erwies sich auch das Kit von Qiagen als ungeeignet für eine verlässliche Quantifizierung von EBV-miRNAs aus Vollblut.

Die benötigte Genauigkeit der Poly(A)-PCR beim Nachweis von viraler miRNA kann somit nicht allein durch den Vorwärtsprimer erreicht werden, sondern es ist mindestens ein weiteres spezifisches Element nötig. Hier könnte der Einsatz einer spezifischen Taqman-Sonde die Differenzierung verbessern, was allerdings in dieser Arbeit nicht getestet wurde. Eine andere Möglichkeit bietet die 3'-Verlängerung der Rückwärtsprimer bis in die miRNA-spezifische Sequenz, was ebenfalls in dieser Arbeit nicht verfolgt wurde.

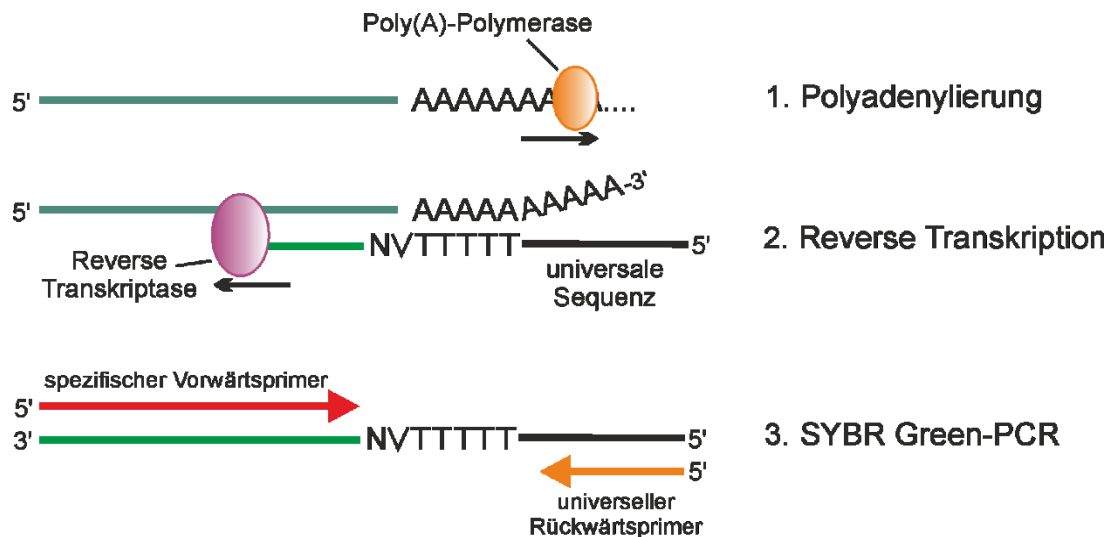


Abbildung 23: Schematischer Ablauf der miRNA-Detektion mittels miScript-Assay. (Quelle: Eigenerstellung)

6.2.2. Loop-PCR

Ein spezifischer Nachweis von miRNA ist aufgrund ihrer kurzen Basensequenz sehr schwierig. Für die Detektion im Northern Blot werden die Sonden so konstruiert, dass sie über die gesamte Länge an die miRNA binden, wodurch die Spezifität sehr hoch ist und falsch-positive Nachweise von ähnlichen miRNAs minimiert werden können (Kim, Seo et al. 2013). Bei einem PCR-basierten Nachweis müssen an die nur 18-25 nt lange virale miRNA Sequenz sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtsprimere binden, was in einer herkömmlichen PCR nicht möglich ist. Durch die 2004 entwickelte Loop-PCR wird dieses Problem elegant umgangen (Chen, Ridzon et al. 2005), da hier die miRNA über einen spezifischen geloopten Primer in der Reversen Transkription verlängert wird und somit eine ausreichend lange cDNA entsteht, welche in einer PCR amplifiziert werden kann.

Basierend auf dieser Methode wurde 2009 ein Sonden-basiertes PCR-Design für den Nachweis von EBV-miRNA publiziert (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009). Die Forschergruppe um Cosmopoulos transkribierte alle EBV-miRNAs gleichzeitig in cDNA, um Kosten und Zeitaufwand zu minimieren. Sie verwendeten dabei einen Mix aus insgesamt 40 RT-Primern mit einer Endkonzentration von je nur 12,5 nM. Das von Cosmopoulos beschriebene Prinzip sollte auch zur Analyse der Blutproben in dieser Arbeit verwendet werden, allerdings mit nur 12 ausgewählten Primer- und Sondensequenzen, deren Spezifität mit Hilfe von synthetischen miRNAs als Zielsequenzen in unterschiedlichen Konzentrationen validiert wurde. Dabei zeigte sich schon früh in der Validierungsphase, dass diese Methode nicht sehr spezifisch und für die Quantifizierung der EBV-miRNA aus humanem Material ungeeignet ist. Damit muss die

bereits publizierte Arbeit von Cosmopoulos *et al.* kritisch hinterfragt werden. Vor allem die Primer für die miRNAs, miR-BART5-5p, -6-5p und -7-3p, wiesen deutliche durch Autoamplifikation bedingte Kreuzreaktionen auf, die zu unspezifischen Signalen geführt haben. Zusätzlich zeigten auch die BHRF1-1 und BART7-3p Primer und Taqman-Sonden bei Kontrollreaktionen ohne RNA Signale, die sich durch Kreuzreaktivität zwischen RT-Primer und den einzelnen Taqman-Sonden erklären lassen (Abbildung 7). Die Amplifikate erwiesen sich bei der Auftrennung im Gel als unspezifisch. Für miR-BHRF1-1 können die Unspezifitäten nicht über ihre Sequenz erklärt werden, wo hingegen bei miR-BART7-3p die Ursache wahrscheinlich in einer Wiederholung der Basenabfolge GUCCA liegt. An die erste Wiederholung bindet der Vorwärtsprimer und an die zweite der RT-Primer. Da beide Primer in komplementärer Richtung an die miRNA binden, können sie sich auch ohne RNA über diese 5 nt aneinander lagern und ein Amplifikat erzeugen. Dieses wird dann über die Taqman-Sonde detektiert, weil ihre Sequenz identisch mit dem 3'-Ende des RT-Primers ist (Abbildung 24). Die miR-BART-7-3p wird deshalb nicht überraschender- aber fälschlicherweise in vielen Publikationen als hoch exprimierte EBV miRNA beschrieben (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009, Gourzones, Gelin et al. 2010, Kawano, Iwata et al. 2013). Der Nachweis und Quantifizierung von miR-BART-7-3p ist mit diesem, auch kommerziell verfügbarem qPCR-Design zweifelhaft, was in der vorgelegten Arbeit gezeigt und auch schon in einem Leserbrief kritisiert wurde (Malkewitz, Makarewicz et al. 2014). Eine Differenzierung bei hohen miRNA-Konzentrationen ist zwar möglich, aber das unspezifische Produkt verfälscht die Quantifizierung in der qPCR, in der keine Differenzierung vorgenommen wird und die deshalb saubere Amplifikate benötigt.

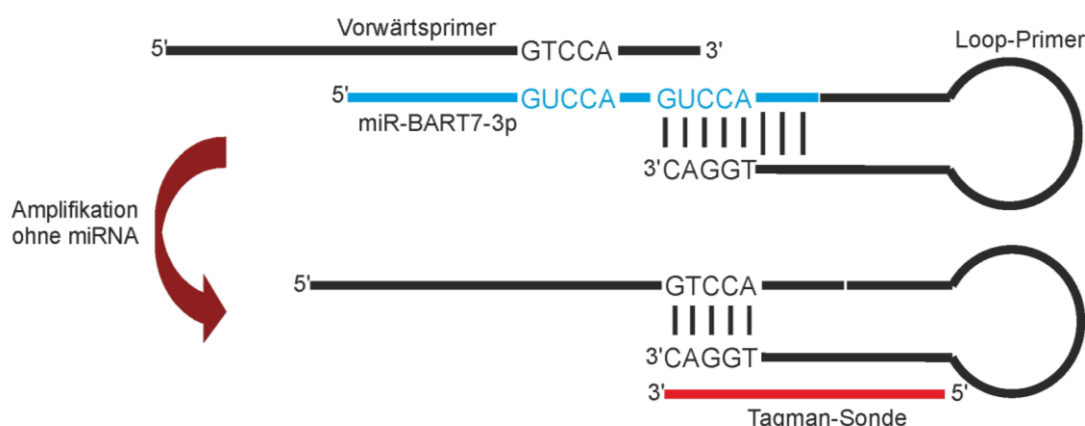


Abbildung 24: Detektion des Loop-Primers in der Taqman-basierten PCR bei miR-BART7-3p. (Quelle: Eigenerstellung)

Für eine Analyse der asservierten Blutproben war die Taqman-basierte Loop-PCR somit ebenfalls nicht geeignet. Viele kommerzielle Kits arbeiten mit diesem System und sollten deshalb vor einer möglichen Verwendung genauestens validiert werden. Zu empfehlen wäre neben der üblichen NTC auch eine NRT-Kontrolle und eine zumindest anfängliche Überprüfung aller Amplifikate im Gel.

6.2.3. Loop-SYBR Green PCR

Für den Nachweis der EBV-miRNAs aus den Patientenproben wurde eine Kombination aus der RT nach Chen *et al.* (Loop-PCR) und Quantifizierung mittels SYBR Green miteinander kombiniert. Das Problem der unspezifischen Signale in der qPCR konnte durch SYBR Green anstelle von Taqman-Sonden für alle hier adressierten miRNAs gelöst werden. Diese Methode wurde auch bereits erfolgreich getestet und publiziert (Varkonyi-Gasic, Wu *et al.* 2007, Chen, Chen *et al.* 2010). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sowohl bei der RT als auch bei der PCR spezifische Primer zum Einsatz kommen und dadurch die Kreuzreaktionen reduziert werden. Durch die Verwendung von SYBR Green an Stelle einer Taqman-Sonde konnte zudem jedes Amplifikat nach der PCR in einer Schmelzkurve analysiert werden, so dass unspezifische Signale, wie sie teilweise bei seronegativen Proben auftraten, sofort sichtbar wurden. Eine Verkürzung des Vorwärtsprimers, welcher ursprünglich mit dem RT-Primer um wenige Basen überlappte und eine potentielle Autoamplifikation bedingte, eliminierte die unspezifischen Signale bei allen getesteten miRNAs. Zudem konnte durch eine Erhöhung der Konzentration der RT-Primer von 12,5 nM auf 50 nM, wie in der Erstpublikation zur Loop-PCR beschrieben wurde (Chen, Ridzon *et al.* 2005), die Spezifität der Methode weiter verbessert werden.

Zur Signalverstärkung wurde zusätzlich eine Präamplifikation vor der PCR durchgeführt. Da jedoch nicht alle unspezifischen Signale vollständig eliminiert werden konnten, diente die Gruppe der seronegativen Patienten als Referenz, auf die alle Ergebnisse normalisiert und so falsch-positive oder zu starke Signale relativiert wurden.

6.3. Differenziale Expression der EBV miRNAs während der verschiedenen Infektionsphasen

EBV ist aufgrund seiner Häufigkeit und der vielfältigen Krankheitsbilder ein beliebtes Untersuchungsobjekt. Viele Publikationen beschäftigen sich dabei mit der Suche nach Marker-miRNAs für eine potentielle Diagnostik verschiedener EBV-induzierter Erkrankungen (Zhang, Zong et al. 2015, Zheng, Lu et al. 2016). Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf EBV-assoziierten Tumoren, wie dem Burkitt-Lymphom oder dem Nasopharyngealkarzinom (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009, Chen, Chen et al. 2010) und nur wenige Publikationen untersuchen die miRNA-Expression bei Infektiöser Mononukleose oder chronischen EBV-Verläufen (Kawano, Iwata et al. 2013, Gao, Ai et al. 2015, Zhou, Xie et al. 2015). Für Reaktivierungen hingegen gibt es noch keine Studien zu dem Expressionsprofil der EBV-miRNAs.

In dieser Arbeit sollten deshalb die Expressionsprofile der verschiedenen Infektionsphasen verglichen werden, um geeignete Marker oder Therapieansatzpunkte bei den miRNAs zu identifizieren. Als interne Referenz diente die humane miR-16, da für diese bereits gezeigt wurde, dass sie stabil im Blut exprimiert wird (Mitchell, Parkin et al. 2008). Dies reflektierten auch die konstanten absoluten Molekülzahlen der miR-16 (Abbildung 13). Mögliche Schwankungen der miR-16 Expression, wie sie durch Hämolyse bei Plasma als Untersuchungsmaterial auftreten können (Chen, Wang et al. 2008), wurden somit durch die Verwendung von Vollblut kompensiert.

Die EBV-miRNAs miR-BART20-5p und BHRF-1-2 konnten in keiner einzigen Probe nachgewiesen werden, was wahrscheinlich einer unzureichenden Sensitivität der PCR geschuldet war. Ebenso bei miR-BART13-3p, welche jedoch in anderen Studien bei Erstinfektionen besonders hoch exprimiert war (Gao, Ai et al. 2015, Zhou, Xie et al. 2015). Allerdings wurden in diesen Studien schlecht validierte Methoden verwendet, was eher auf unspezifische Signale hindeutet, da in den genannten Arbeiten sogar die Kontrollproben ein hohes Level an miR-BART-13-3p aufwiesen. Entsprechend detektierten auch Mikroarray-basierte Systeme starke Expression dieser miRNA in EBV-negativen Proben (Fink, Gandhi et al. 2014). Bei anderen Studien, welche das Taqman-basierte System verwendeten, war miR-BART13-3p hingegen kaum exprimiert (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011, Kawano, Iwata et al. 2013). Neuere Untersuchungen zeigten, dass miR-BART13-3p die Calcium-abhängigen Signalwege über STIM1 reguliert. Ein besonders hohes Level lag vor allem in den Speicheldrüsen vor, wo es die

Speichelproduktion beeinflusst (Gallo, Jang et al. 2016). Dies könnte auch im Zusammenhang mit der Überexpression bei Nasopharyngealkarzinomen (NPC) zusammenhängen, wodurch miR-BART-13-3p sogar als Marker für diese Tumore diskutiert wird (Zhang, Zong et al. 2015). Die fehlende Expression dieser miRNA in den Blutproben deutet darauf hin, dass der miR-BART13-3p im Blutzellen keine besondere Funktion zukommt;

6.3.1. Erstinfektionen

In der vorliegenden Studie wurden drei miRNAs identifiziert, welche bei Erstinfektionen besonders stark exprimiert werden: miR-BHRF1-1, BART2-5p und -5-5p (Abbildung 15). Das BHRF1-Cluster und vor allem miR-BHRF1-1 wurde auch in anderen Untersuchungen von Infektiöser Mononukleose in hohen Kopienzahlen gefunden (Kawano, Iwata et al. 2013, Gao, Ai et al. 2015), wobei ein direkter Vergleich durch die unterschiedliche epidemiologische Herkunft der Kohorte und die verschiedenen Detektionsmethoden schwierig ist. Dennoch scheint miR-BHRF1-1 der bislang beste miRNA-Marker für eine Erstinfektion zu sein. Kurz nach Auftreten der ersten Symptome sinkt die Expression jedoch schnell ab, was die eigenen Ergebnisse (Abbildung 17) und die Arbeit von Gao et al zeigen (Gao, Ai et al. 2015). Dies könnte erklären, warum sie nur bei 57 % der Erstinfektionen in dieser Studie nachgewiesen werden konnte. Eine zu späte Probennahme erklärt auch die Detektion der BART-miRNAs in dieser Studiengruppe. Hier waren besonders miR-BART2-5p und -5-5p hoch reguliert. BART2-5p reguliert zum einen die virale DNA-Polymerase BALF5 und inhibiert damit die lytische Replikation (Barth, Pfuhl et al. 2008). Zum anderen inhibiert sie die Transkription einiger humaner mRNAs. So reduziert miR-BART2-5p die Expression des zellulären Proteins MICB, welches als Ligand für die Erkennung von infizierten Zellen durch NK-Zellen fungiert (Lo, Dawson et al. 2012), inhibiert aber auch die Bildung von Interleukin 12 (Tagawa, Albanese et al. 2016) und des lysosomalen Enzyms Legumain (kodiert durch das *LGMM*-Gen), wodurch die Antigenpräsentation gehemmt wird (Albanese, Tagawa et al. 2017). Damit spielt miR-BART2-5p eine wichtige Rolle für den Übergang vom lytischen Zyklus in die Latenz und die Immunevasion des Virus. Zudem verhindert miR-BART5-5p eine Apoptose der infizierten Zelle durch die Regulation des pro-apoptotischen Proteins PUMA (Choy, Siu et al. 2008) und trägt damit auch zur Immunevasion bei. Eine besonders starke Überexpression im Vergleich zu Reaktivierung und Kontrollgruppe zeigte neben miBART2-5p auch miBART15-3p. Diese reguliert die Inflammosombildung über die Bindung an NLRP3, ein zentrales Protein der Inflammosomen und reduziert damit

letztendlich die IL-1 β Ausschüttung (Haneklaus, Gerlic et al. 2012), was zu einer zusätzlichen Abschwächung der Entzündungsreaktion führt.

In anderen Studien wurden hohe Level von miR-BART7-3p nachgewiesen (Kawano, Iwata et al. 2013, Gao, Ai et al. 2015, Zhou, Xie et al. 2015), was in dieser Studie jedoch nur bedingt gezeigt werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass Kawano *et al.* in allen Gruppen -inklusive seronegativen Patienten- eine starke Expression von miR-BART7-3p nachweisen konnte, was darauf hinweist, dass die Signale durch unspezifische Reaktionen und nicht durch einen tatsächlichen Nachweis von viraler miRNA bedingt waren. Diese Kritik an der Arbeit von Kawano *et al.* wurde aufgrund der eigenen Ergebnisse in einem publizierten Leserbrief (Malkewitz, Makarewicz et al. 2014) geäußert. Eine Relativierung der Daten auf seronegative Patienten hätte die Unspezifitäten kompensiert, wurde aber nicht durchgeführt. Die Forschergruppe konnte zudem eine Korrelation zwischen den miRNAs und der Viruslast feststellen (Kawano, Iwata et al. 2013). Dies konnte in der vorliegenden Studie bei den Erstinfektionen nur für miR-BHRF1-1 und BART7-3p gezeigt werden. Jedoch korrelierten einige miRNAs untereinander. So bestand eine besonders gute Korrelation zwischen miR-BART7-3p, -1-5p, -5-5p und miR-BHRF1-1, welche alle die Apoptose unterdrücken (Cai, Schafer et al. 2006, Choy, Siu et al. 2008, Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011, Feederle, Haar et al. 2011) und damit zum Überleben der infizierten Zellen beitragen.

6.3.2. Reaktivierungen

Innerhalb der Reaktivierungen gab es kaum signifikante Unterschiede der EBV-miRNAs im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies war vermutlich durch die geringere Replikationsaktivität des Virus bedingt, was auch an der durchschnittlich niedrigen Viruslast sichtbar wurde. Nach miR-BHRF1-1 waren miR-BART6-5p und -5-5p am stärksten exprimiert, wobei nur letztere signifikant erhöht war im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit konnte keine eindeutige Marker-miRNA für die Reaktivierungsphase ermittelt werden und eine Zuordnung zu einer bestimmten Latenzphase war auch nicht möglich. Erschwerend kommt hinzu, dass bisherige Untersuchungen zu den miRNA-Expressionsprofilen der drei Latenzphasen an jeweils verschiedenen Zelllinien durchgeführt wurden und dadurch sehr diffuse Ergebnisse lieferten (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011). Die Latenz III zum Beispiel zeigte in der Raji-B-Zelllinie eine hohe Expression für das BHRF1-Cluster, während das gesamte BART-Cluster nur sehr gering exprimiert wurde. B95-8-Zellen hingegen besitzen eine

erhöhte Expression von allen vorhandenen BART-miRNAs und Namalwa-Zellen zeigten kaum Expression viraler miRNAs (Yang, Huang et al. 2013), obwohl diese auch in Latenz III eingeordnet werden. Infizierte Zelllinien, welche sich in Latenz I und II befinden, haben ein hohes Level aller EBV-miRNAs, teilweise inklusive dem BHRF1-Cluster (Yang, Huang et al. 2013). Insgesamt sollte zudem zwischen *in vivo* und *in vitro*-Material differenziert werden, da NPC-Biopsieproben keine BHRF1-Expression besitzen, NPC-Zelllinien jedoch schon (Cosmopoulos, Pegtel et al. 2009, Yang, Huang et al. 2013). Dies lässt sich durch die *in vivo*-Bedingungen erklären. Ein Teil der Zellen wird durch die häufigen Teilungen in kultivierten Zelllinien immer in die lytische Phase übergehen, da keine Gefahr besteht vom Immunsystem erkannt und eliminiert zu werden, wobei dann das BHRF1-Cluster exprimiert wird. Ein Vergleich der miRNA-Expressionsmustern zwischen Nativmaterial, wie Blut oder Biopsien, und etablierten Zelllinien ist daher immer kritisch zu hinterfragen.

6.3.3. Identifizierung der Infektionsphase

Eine der Fragestellungen in der Studie war: Ist es möglich das Stadium einer EBV-Infektion über das miRNAs-Expressionsprofil zu bestimmen? Bei sieben Probanden mit positiver Viruslast fehlten die serologischen Daten, so dass diese nicht klar einer Erstinfektion oder Reaktivierung zugeordnet werden konnten. Anhand eines Vergleiches mit den ermittelten Expressionsprofilen könnte eine mögliche Erstinfektion in einer der Proben vorgelegen haben, was allerdings nicht mit Laborwerten belegt wurde. Bei allen anderen Proben war dies jedoch nicht möglich, was durch den starken Abfall der miRNA-Konzentrationen im Verlauf einer Erstinfektion bedingt sein könnte (Gao, Ai et al. 2015), ein Phänomen welches auch in dieser Studie anhand einer Probandin sichtbar wurde (Abbildung 17). Damit erscheint eine zuverlässige Diagnostik basierend auf dem miRNA-Profil immer noch schwierig. Um diese zu verbessern, müssten die Expressionsprofile von wesentlich mehr Probanden mit definierten Entnahmezeitpunkten als Vergleichsdatenbasis dienen. Eine solche Probenbank müsste dann auch unter standardisierten Bedingungen der Probenentnahme, Aufreinigung und Quantifizierung angelegt werden.

Über die Expressionsprofile konnten auch zwei Proben von Patienten mit einer klaren PTLD untersucht werden, welche nicht einem der prädefinierten Phänotypen entsprachen und damit nicht in die kumulative Analyse der Studie eingingen. Die zwei PTLD-Fälle stimmten mit keinem der ermittelten Studienprofile überein (Abbildung 18). Auffällig bei

einer der Proben war die fehlende Expression vieler EBV-miRNAs. Darunter waren auch miR-BART9-3p und -1-5p. Diese regulieren beide das virale Membranprotein LMP1, welches als ein zentrales Protein für Tumorgenese identifiziert wurde (Lo, Dawson et al. 2012). Ein Fehlen von miR-BART9-3p und 1-5p führt zu einer erhöhten Expression von LMP1 und könnte damit möglicherweise ein Auslöser für die PTLD sein. Dies wurde zwar bislang noch in keiner Publikation beschrieben, könnte aber ein sehr interessanter Ansatzpunkt für weitere Forschungen, sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie sein. Bei der anderen Probe hingegen konnten mehr miRNAs detektiert werden, was keinen Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen darstellt. In einer anderen Studie wurden die Expressionsprofile der EBV-miRNAs bei PTLD mittels microArray untersucht (Fink, Gandhi et al. 2014). Dabei zeigte sich, dass es 2 Typen von PTLD Expressionsprofilen gibt: einen mit hohen Level vieler miRNAs und einen zweiten mit kaum detektierbaren EBV-miRNAs.

Zusätzlich konnte eine wertvolle Probe eines Patienten mit HLH akquiriert werden. Auch dieser Fall wurde gesondert untersucht und mit den ermittelten miRNA-Expressionsprofilen verglichen (Abbildung 18). Das HLH-Profil entspricht größtenteils dem einer Reaktivierung, was auch dem klinischen Hintergrund entspricht, da der Patient die HLH im Rahmen einer EBV-Reaktivierung entwickelte. Insgesamt ist das Expressionslevel bei der HLH geringer als bei einer Reaktivierung und besonders im Vergleich zu Erstinfektionen. Dies widerspricht jedoch einer anderen Studie von Zhou *et al.*, welche EBV-bedingte HLH untersuchte. Dort war die miR-BHRF1-1 nur gering exprimiert, wo hingegen die BART-miRNAs deutlich über dem Expressionslevel von Erstinfektionen lag (Zhou, Xie et al. 2015). Dabei war vor allem die miR-BART13-3p in hohen Konzentrationen gefunden wurden, was jedoch eher durch die o.g. methodischen Schwächen bedingt war und somit hinterfragt werden sollte, da auch die Kontrollen hohe Level dieser miRNA aufwiesen. Im Vergleich zum durchschnittlichen miRNA-Profil einer Reaktivierung fällt auf, dass miR-BART6-5p, 7-3p und 15-3p fehlen. Besonders letztere wäre eine mögliche Erklärung für die Ausprägung einer HLH, da diese, wie zuvor schon erwähnt, die Inflammation reguliert und die HLH selbst durch eine Hyperinflammation gekennzeichnet ist. Für eine valide Aussage zum Expressionsprofil der EBV-miRNA bei einer HLH müssten allerdings noch mehr Proben untersucht werden, was jedoch nicht das primäre Ziel dieser Studie war und auf Grund der geringen Fallzahlen den zeitlichen Rahmen überschritten hätte.

6.4. Zielgerichtete Regulation von EBV-infizierten Zellen

EBV gilt neben der typischen Infektiösen Mononukleose auch als Auslöser vieler epithelialer und lymphatischer Tumore sowie lymphoproliferativer Erkrankungen (Cohen 2015). Es wird aber auch als Ursache bzw. Verstärker verschiedener Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose oder rheumatoider Arthritis diskutiert (Lunemann, Kamradt et al. 2007, Draborg, Duus et al. 2013). Eine Therapiemöglichkeit oder Impfung gegen das Virus gibt es bis heute nicht (Ebell 2004, Cui, Cao et al. 2016), jedoch bereits einige Entwicklungsansätze. So konnte durch die Impfung des EBV-Glykoproteins gp350 in einer Phase II-Studie gezeigt werden, dass dies die Wahrscheinlichkeit eine Infektiöse Mononukleose auszubilden deutlich verringerte. Eine Infektion mit dem Virus konnte dadurch allerdings nicht verhindert werden und ein Schutz vor EBV-induzierten Tumoren bestünde nach Einschätzung der Autoren auch nicht. Zudem bildeten einige Probanden keine Antikörper aus, so dass der Impferfolg ausblieb (Cohen, Mocarski et al. 2013, Cohen 2015). Andere Impfstoffe, welche auf einen therapeutischen Effekt zielen, beinhalten zumeist verschiedene virale Latenzproteine und aktivieren damit die T-Zellantwort zur verstärkten Bekämpfung der infizierten Zellen durch das Immunsystem. Damit könnten diese Impfstoffe potentiell auch zur Therapie von EBV-induzierten Tumoren eingesetzt werden (Cohen 2015).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Behandlung mit regulatorischen RNAs, wie siRNAs oder miRNAs, was auch in dieser Arbeit getestet wurde. Die sogenannte „intelligente“ siRNA wird durch ein am 3'-Ende gekoppeltes Peptid inaktiviert. Die hier ausgewählte Peptidsequenz war spezifisch für die BVRF2-kodierte EBV-Protease (Larrat, Morand et al. 2009). Die Übertragung der siRNA erfolgte in alle Zellen; eine Aktivierung konnte aber nur dort stattfinden, wo auch die entsprechende Protease gebildet wurde. In den Versuchen war jedoch trotz hoher Konzentrationen transfizierter „intelligenter“ siRNA kein *Silencing*-Effekt nachweisbar (Abbildung 21). Die Kontroll-siRNA ohne Peptid erzielte eine effiziente Reduktion der entsprechenden mRNA. Trotz nachweisbarer Expression der EBV-Protease in allen Proben (Abbildung 26) schien die Menge nicht ausreichend, um die siRNA zu aktivieren. Mögliche Ursache dafür ist, dass die Protease als zentraler Bestandteil für den Zusammenbau des Kapsid, der Proteinhülle des Virus, nur in der lytischen Phase gebildet wird (Larrat, Morand et al. 2009). EBV-infizierte B-Zelllinien (Cameron, Fewell et al. 2008) und 99 % der infizierten Zellen während einer akuten Infektion befinden sich jedoch in der Latenz (Hochberg, Souza et al. 2004). Für einen therapeutischen Einsatz gegen EBV wäre die „intelligente“ siRNA somit nicht geeignet.

Die Kopplung der siRNA an ein anderes EBV-spezifisches Peptid ist jedoch kaum möglich, da das Virus nur eine beschriebene Protease besitzt. Es gibt einen anderen Ansatz, bei dem die EBV-Protease direkt über siRNA reguliert wird. Dabei konnte die Produktion der Viruspartikel um bis zu 95 % gesenkt werden (Larrat, Morand et al. 2009). Jedoch ist auch hier das Problem, dass diese Therapie wieder nur in der lytischen Phase greift, welche im menschlichen Organismus sehr selten vorliegt. Ein therapeutischer Effekt ist damit auch hier eher unwahrscheinlich.

Eine EBV-Infektion mit komplementären RNAs (anti-miRs) zu behandeln, wäre eine gute Alternative. Damit könnten, wie bei den darauf basierenden Therapeutika Miravirsen oder Fomivirsen, gezielt bestimmte virale miRNAs inaktiviert werden. Da während einer Erstinfektion miR-BHRF1-1, BART6-5p und -7-3p besonders hoch exprimiert sind, würden sich diese als Angriffspunkt für eine EBV-Therapie eignen. Welchen Einfluss dies auf den Infektionsverlauf hätte, ist jedoch schwer abschätzbar. Zudem wäre ein messbarer Effekt während einer Reaktivierung eher unwahrscheinlich, da diese drei miRNAs hier deutlich geringer exprimiert werden. Auch bei EBV-induzierten Tumoren unterscheidet sich das Expressionsprofil stark von dem einer Erstinfektion, so dass wahrscheinlich für jede EBV-induzierte Erkrankung andere anti-miRs entwickelt werden müssten, um einen Behandlungserfolg zu erzielen.

Ein besserer Therapieansatz wäre möglicherweise der Einsatz einer siRNA, welche gegen die BART-mRNA gerichtet ist. Da alle BART-miRNA aus demselben Transkript gebildet werden (Amoroso, Fitzsimmons et al. 2011), könnte die Prozessierung und Translation des gesamten Clusters inhibiert werden. Wichtige miRNAs von Erstinfektionen, Reaktivierungen und vor allem Tumoren würden damit eliminiert und das Virus in seinen Regulationsmöglichkeiten stark eingeschränkt werden. Die Latenz könnte nicht mehr aufrechterhalten werden und die infizierten Zellen würden in die Lyse bzw. Apoptose übergehen. Tumorgewebe würde sich selbst limitieren und der Effekt wäre vergleichbar mit herkömmlichen Chemotherapeutika (Janssen, Reesink et al. 2013). Zusätzlich würden eine bessere Erkennung und damit eine verbesserte Bekämpfung der Infektion durch das Immunsystem wieder möglich. Ohne miR-BART2-5p und -3-5p würde vermehrt MICB gebildet werden, wodurch infizierte Zellen besser erkannt werden könnten. Zudem kann durch die fehlende miR-BART15 die Inflammasombildung gesteigert und damit die aktive Bekämpfung der Infektion gestartet werden (Nachmani, Stern-Ginossar et al. 2009, Haneklaus, Gerlic et al. 2012).

Bei all diesen Ansätzen bleibt jedoch immer ein großes Problem bestehen: Wie gelangt das Therapeutikum an den Wirkort? Durch die Persistenz in B-Zellen ist das Virus selbst kaum angreifbar, da diese Zellen sehr resistent gegen fast alle chemischen Transfektionsmethoden sind (Seiffert, Stilgenbauer et al. 2007). Nukleinsäuren konnten bislang meist nur durch die kurzzeitige Änderung der Zellmembran-Permeabilität mittels Elektroporation (Seiffert, Stilgenbauer et al. 2007, Banerjee, Lu et al. 2014) oder Sonoporation (Ling Yong, Siak-Wei Ow et al. 2014) effizient in B-Zellen übertragen werden, was jedoch für eine Anwendung am Menschen nicht geeignet ist. Eine effiziente Übertragung von Substanzen über Nanopartikel (Zhou, Wu et al. 2017) oder Liposomen (Yu, Mao et al. 2013, Ono, Sato et al. 2014) in B-Lymphomzellen wurde in einem anderen Zusammenhang allerdings prinzipiell gezeigt und wäre ein möglicher und effizienter Weg, die EBV-Infektion mittels anti-miRs oder siRNAs zu bekämpfen oder zu kontrollieren.

7. Schlussfolgerungen

Kleine regulatorische RNAs gewinnen zunehmend an Bedeutung und die Rolle der miRNAs innerhalb der einzelnen Zellprozesse wird deutlicher. Studien zeigen, dass die Reduzierung oder Aktivierung einer einzigen miRNA große Auswirkungen auf eine Zelle haben kann. Auch deshalb werden miRNAs immer attraktiver als Angriffspunkt für spezifische Therapien, vor allem bei Erkrankungen bei denen es bislang keine oder nur wenige Behandlungsmöglichkeiten gibt. Durch die Persistenz in B-Zellen und die extrem geringe Expression von Pathogenitätsfaktoren ist es bei EBV besonders schwer einen Zugang für eine gezielte Behandlung zu finden. miRNAs bieten eine Möglichkeit, um in die Regulation des Virus eingreifen zu können. Da EBV über seine miRNAs nicht nur infizierte sondern auch nicht-infizierte Zellen kontrollieren kann, demonstriert dies die zentrale Rolle der miRNAs für die Viruspathogenität. Voraussetzung für die Entwicklung einer Therapie ist jedoch die Identifikation der richtigen Ziel-miRNA durch Untersuchungen des Infektionsverlaufes in humanen Proben. Dabei liegt derzeit das größte Problem in den unterschiedlichen verwendeten Nachweis- und Auswertungsmethoden, die oft schlecht validiert und damit unzuverlässig sind. Für die Vergleichbarkeit aller Ergebnisse ist eine einheitliche Methodik zur Ermittlung von Expressionsprofilen notwendig. Dabei ist es immer ratsam, die Methode anhand von seronegativen Proben zu normalisieren, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Diese Arbeit stellt eine Methode vor, die den Versuch unternimmt dieser Aufgabe gerecht zu werden.

Auch wenn intensiv an Impfstoffen gegen EBV geforscht wird, so könnten diese nach derzeitigem Kenntnisstand eine Infektion mit dem Virus oder die EBV-induzierte Tumorgenese nicht verhindern. Etwa 80 % aller PTL-D-Fälle sind auf dieses Virus zurückzuführen. Weltweit sterben jedes Jahr etwa 140.000 Menschen an EBV-assoziierten Tumoren und jedes Jahr entwickeln etwa 60-100 von 100.000 Personen der kaukasischen Bevölkerung eine Infektiöse Mononukleose (Hjalgrim, Friborg et al. 2007, Khan and Hashim 2014). Die Entwicklung eines Therapeutikums zur Behandlung einer bestehenden EBV-Infektion ist daher eine lohnenswerte Aufgabe.

Für eine mögliche miRNA-basierte EBV-Diagnostik und -Therapie können deshalb aus den hier ermittelten Expressionsprofilen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Die miR-BHRF1-1 könnte als Marker für eine frühe Erstinfektion dienen. Sie ist aber als

Ziel einer EBV-Therapie eher ungeeignet, weil sie hauptsächlich zu Beginn einer Infektion besonders hoch exprimiert wird, wo der Patient oftmals noch keine Symptome aufweist und deshalb auch keinen Arzt aufsucht. Das BART-Cluster hingegen wird in allen Latenzphasen exprimiert und ist auch während einer Erstinfektion (miR-BART2-5p und 5-5p) in hoher Menge nachweisbar. Das BART-Cluster ist aber auch bei Reaktivierungen (besonders miR-BART5-5p) und besonders bei EBV-induzierten Tumoren von Bedeutung. Es eignet sich damit gut als therapeutisches *Target*, vor allem da alle 40 BART-miRNAs aus demselben Transkript gebildet werden. Mit einer zielgerichteten siRNA könnten potentiell 90 % der EBV-miRNAs eliminiert werden. Um ein siRNA-basiertes Therapeutikum zu entwickeln, muss allerdings die gezielte Aufnahme in die B-Zellen erst bewerkstelligt werden. Für dieses könnten nanopartikuläre Träger, wie Liposomen, nach dem heutigen Stand der Technik die beste Option darstellen.

8. Quellen

- Albanese, M., T. Tagawa, A. Buschle and W. Hammerschmidt (2017). "MicroRNAs of Epstein-Barr Virus Control Innate and Adaptive Antiviral Immunity." J Virol **91**(16).
- Alexander, M., R. Hu, M. C. Runtsch, D. A. Kagele, T. L. Mosbruger, T. Tolmachova, M. C. Seabra, J. L. Round, D. M. Ward and R. M. O'Connell (2015). "Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin." Nat Commun **6**: 7321.
- Amoroso, R., L. Fitzsimmons, W. A. Thomas, G. L. Kelly, M. Rowe and A. I. Bell (2011). "Quantitative studies of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs provide novel insights into their regulation." J Virol **85**(2): 996-1010.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait and M. Tewari (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5003-5008.
- Balfour, H. H., Jr., S. K. Dunmire and K. A. Hogquist (2015). "Infectious mononucleosis." Clin Transl Immunology **4**(2): e33.
- Balfour, H. H., Jr., O. A. Odumade, D. O. Schmeling, B. D. Mullan, J. A. Ed, J. A. Knight, H. E. Vezina, W. Thomas and K. A. Hogquist (2013). "Behavioral, virologic, and immunologic factors associated with acquisition and severity of primary Epstein-Barr virus infection in university students." J Infect Dis **207**(1): 80-88.
- Balfour, H. H., Jr., F. Sifakis, J. A. Sliman, J. A. Knight, D. O. Schmeling and W. Thomas (2013). "Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition." J Infect Dis **208**(8): 1286-1293.
- Banerjee, S., J. Lu, Q. Cai, Z. Sun, H. C. Jha and E. S. Robertson (2014). "EBNA3C augments Pim-1 mediated phosphorylation and degradation of p21 to promote B-cell proliferation." PLoS Pathog **10**(8): e1004304.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Barth, S., T. Pfuhl, A. Mamiani, C. Ehse, K. Roemer, E. Kremmer, C. Jaker, J. Hock, G. Meister and F. A. Grasser (2008). "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5." Nucleic Acids Res **36**(2): 666-675.
- Cai, X., A. Schafer, S. Lu, J. P. Bilello, R. C. Desrosiers, R. Edwards, N. Raab-Traub and B. R. Cullen (2006). "Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed." PLoS Pathog **2**(3): e23.
- Cameron, J. E., C. Fewell, Q. Yin, J. McBride, X. Wang, Z. Lin and E. K. Flemington (2008). "Epstein-Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression." Virology **382**(2): 257-266.
- Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak and K. J. Guegler (2005). "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." Nucleic Acids Res **33**(20): e179.

- Chen, S. J., G. H. Chen, Y. H. Chen, C. Y. Liu, K. P. Chang, Y. S. Chang and H. C. Chen (2010). "Characterization of Epstein-Barr virus miRNAome in nasopharyngeal carcinoma by deep sequencing." PLoS One **5**(9).
- Chen, S. Y., Y. Wang, M. J. Telen and J. T. Chi (2008). "The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases." PLoS One **3**(6): e2360.
- Chery, J. (2016). "RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications." Postdoc J **4**(7): 35-50.
- Cho, E. Y., K. H. Kim, W. S. Kim, K. H. Yoo, H. H. Koo and Y. H. Ko (2008). "The spectrum of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in Korea: incidence of disease entities by age groups." J Korean Med Sci **23**(2): 185-192.
- Choy, E. Y., K. L. Siu, K. H. Kok, R. W. Lung, C. M. Tsang, K. F. To, D. L. Kwong, S. W. Tsao and D. Y. Jin (2008). "An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival." J Exp Med **205**(11): 2551-2560.
- Cohen, J. I. (2015). "Epstein-barr virus vaccines." Clin Transl Immunology **4**(1): e32.
- Cohen, J. I., E. S. Mocarski, N. Raab-Traub, L. Corey and G. J. Nabel (2013). "The need and challenges for development of an Epstein-Barr virus vaccine." Vaccine **31 Suppl 2**: B194-196.
- Cortez, M. A., C. Ivan, D. Valdecanas, X. Wang, H. J. Peltier, Y. Ye, L. Araujo, D. P. Carbone, K. Shilo, D. K. Giri, K. Kelnar, D. Martin, R. Komaki, D. R. Gomez, S. Krishnan, G. A. Calin, A. G. Bader and J. W. Welsh (2016). "PDL1 Regulation by p53 via miR-34." J Natl Cancer Inst **108**(1).
- Cosmopoulos, K., M. Pegtel, J. Hawkins, H. Moffett, C. Novina, J. Middeldorp and D. A. Thorley-Lawson (2009). "Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma." J Virol **83**(5): 2357-2367.
- Cui, X., Z. Cao, Q. Chen, S. Arjunaraja, A. L. Snow and C. M. Snapper (2016). "Rabbits immunized with Epstein-Barr virus gH/gL or gB recombinant proteins elicit higher serum virus neutralizing activity than gp350." Vaccine **34**(34): 4050-4055.
- Devulapally, R., N. M. Sekar, T. V. Sekar, K. Foygel, T. F. Massoud, J. K. Willmann and R. Paulmurugan (2015). "Polymer nanoparticles mediated codelivery of anti-miR-10b and anti-miR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy." ACS Nano **9**(3): 2290-2302.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev **18**(5): 504-511.
- Draborg, A. H., K. Duus and G. Houen (2013). "Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases." Clin Dev Immunol **2013**: 535738.
- Dunmire, S. K., J. M. Grimm, D. O. Schmeling, H. H. Balfour, Jr. and K. A. Hogquist (2015). "The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events." PLoS Pathog **11**(12): e1005286.
- Ebell, M. H. (2004). "Epstein-Barr virus infectious mononucleosis." Am Fam Physician **70**(7): 1279-1287.
- Edwards, R. H., A. R. Marquitz and N. Raab-Traub (2008). "Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing." J Virol **82**(18): 9094-9106.
- Epstein, M. A., B. G. Achong and Y. M. Barr (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." Lancet **1**(7335): 702-703.

- Faulkner, G. C., A. S. Krajewski and D. H. Crawford (2000). "The ins and outs of EBV infection." Trends Microbiol **8**(4): 185-189.
- Feederle, R., J. Haar, K. Bernhardt, S. D. Linnstaedt, H. Bannert, H. Lips, B. R. Cullen and H. J. Delecluse (2011). "The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes." J Virol **85**(19): 9801-9810.
- Fink, S. E., M. K. Gandhi, J. P. Nourse, C. Keane, K. Jones, P. Crooks, K. Johrens, A. Korfel, H. Schmidt, S. Neumann, A. Tiede, U. Jager, U. Duhrsen, R. Neuhaus, M. Dreyling, K. Borchert, T. Sudhoff, H. Riess, I. Anagnostopoulos and R. U. Trappe (2014). "A comprehensive analysis of the cellular and EBV-specific microRNAome in primary CNS PTLID identifies different patterns among EBV-associated tumors." Am J Transplant **14**(11): 2577-2587.
- Fisman, D. N. (2000). "Hemophagocytic syndromes and infection." Emerg Infect Dis **6**(6): 601-608.
- Forte, E. and M. A. Luftig (2011). "The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation." Microbes Infect **13**(14-15): 1156-1167.
- Gallo, A., S. I. Jang, H. L. Ong, P. Perez, M. Tandon, I. Ambudkar, G. Illei and I. Alevizos (2016). "Targeting the Ca²⁺ Sensor STIM1 by Exosomal Transfer of Ebv-miR-BART13-3p is Associated with Sjogren's Syndrome." EBioMedicine.
- Gao, L., J. Ai, Z. Xie, C. Zhou, C. Liu, H. Zhang and K. Shen (2015). "Dynamic expression of viral and cellular microRNAs in infectious mononucleosis caused by primary Epstein-Barr virus infection in children." Virol J **12**: 208.
- Gebert, L. F., M. A. Rebhan, S. E. Crivelli, R. Denzler, M. Stoffel and J. Hall (2014). "Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122." Nucleic Acids Res **42**(1): 609-621.
- Gordanpour, A., R. K. Nam, L. Sugar, S. Bacopulos and A. Seth (2012). "MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR)." J Vis Exp(63): e3874.
- Gourzones, C., A. Gelin, I. Bombik, J. Klibi, B. Verillaud, J. Guigay, P. Lang, S. Temam, V. Schneider, C. Amiel, S. Baconnais, A. S. Jimenez and P. Busson (2010). "Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells." Virol J **7**: 271.
- Haneklaus, M., M. Gerlic, M. Kurowska-Stolarska, A. A. Rainey, D. Pich, I. B. McInnes, W. Hammerschmidt, L. A. O'Neill and S. L. Masters (2012). "Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production." J Immunol **189**(8): 3795-3799.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.
- Henter, J. I., A. Horne, M. Arico, R. M. Egeler, A. H. Filipovich, S. Imashuku, S. Ladisch, K. McClain, D. Webb, J. Winiarski and G. Janka (2007). "HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis." Pediatr Blood Cancer **48**(2): 124-131.
- Hjalgrim, H., J. Friberg and M. Melbye (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al. Cambridge.
- Hochberg, D., T. Souza, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga and D. A. Thorley-Lawson (2004). "Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells." J Virol **78**(10): 5194-5204.

- Hydbring, P. and G. Badalian-Very (2013). "Clinical applications of microRNAs." F1000Res **2**: 136.
- Iizasa, H., B. E. Wulff, N. R. Alla, M. Maragkakis, M. Megraw, A. Hatzigeorgiou, D. Iwakiri, K. Takada, A. Wiedmer, L. Showe, P. Lieberman and K. Nishikura (2010). "Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency." J Biol Chem **285**(43): 33358-33370.
- Janka, G. E. (2007). "Hemophagocytic syndromes." Blood Rev **21**(5): 245-253.
- Janssen, H. L., H. W. Reesink, E. J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, A. J. van der Meer, A. K. Patick, A. Chen, Y. Zhou, R. Persson, B. D. King, S. Kauppinen, A. A. Levin and M. R. Hodges (2013). "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." N Engl J Med **368**(18): 1685-1694.
- Jayasooriya, S., T. I. de Silva, J. Njie-jobe, C. Sanyang, A. M. Leese, A. I. Bell, K. A. McAulay, P. Yanchun, H. M. Long, T. Dong, H. C. Whittle, A. B. Rickinson, S. L. Rowland-Jones, A. D. Hislop and K. L. Flanagan (2015). "Early virological and immunological events in asymptomatic Epstein-Barr virus infection in African children." PLoS Pathog **11**(3): e1004746.
- Jiang, K. (2013). "Biotech comes to its 'antisenses' after hard-won drug approval." Nat Med **19**(3): 252.
- Johnson, K. H., C. H. Webb, D. O. Schmeling, R. C. Brundage and H. H. Balfour, Jr. (2016). "Epstein-Barr virus dynamics in asymptomatic immunocompetent adults: an intensive 6-month study." Clin Transl Immunology **5**(5): e81.
- Kang, K., X. Zhang, H. Liu, Z. Wang, J. Zhong, Z. Huang, X. Peng, Y. Zeng, Y. Wang, Y. Yang, J. Luo and D. Gou (2012). "A novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity." PLoS One **7**(11): e48536.
- Kawano, Y., S. Iwata, J. Kawada, K. Gotoh, M. Suzuki, Y. Torii, S. Kojima, H. Kimura and Y. Ito (2013). "Plasma viral microRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection." J Infect Dis **208**(5): 771-779.
- Kenney, S. C. (2007). Reactivation and lytic replication of EBV. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al. Cambridge.
- Khan, G. and M. J. Hashim (2014). "Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010." Infect Agent Cancer **9**(1): 38.
- Kim, D. N., M. K. Seo, H. Choi, S. Y. Kim, H. J. Shin, A. R. Yoon, Q. Tao, S. Y. Rha and S. K. Lee (2013). "Characterization of naturally Epstein-Barr virus-infected gastric carcinoma cell line YCCEL1." J Gen Virol **94**(Pt 3): 497-506.
- Kim do, N. and S. K. Lee (2012). "Biogenesis of Epstein-Barr virus microRNAs." Mol Cell Biochem **365**(1-2): 203-210.
- Lam, J. K., M. Y. Chow, Y. Zhang and S. W. Leung (2015). "siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing." Mol Ther Nucleic Acids **4**: e252.
- Larrat, S., P. Morand, A. Bas, S. Vigne, J. M. Crance, V. Boyer, S. Nicod, L. Grossi, M. Buisson, W. P. Burmeister, J. M. Seigneurin and R. Germi (2009). "Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene." Antivir Ther **14**(5): 655-662.

- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J **21**(17): 4663-4670.
- Ling Yong, C. L., D. Siak-Wei Ow, T. Tandiono, L. L. Mei Heng, K. Kwok-Keung Chan, C. D. Ohi, E. Klaseboer, S. W. Ohi and A. Boon-Hwa Choo (2014). "Microbubble-mediated sonoporation for highly efficient transfection of recalcitrant human B- cell lines." Biotechnol J **9**(8): 1081-1087.
- Lo, A. K., C. W. Dawson, D. Y. Jin and K. W. Lo (2012). "The pathological roles of BART miRNAs in nasopharyngeal carcinoma." J Pathol **227**(4): 392-403.
- Lunemann, J. D., T. Kamradt, R. Martin and C. Munz (2007). "Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis?" J Virol **81**(13): 6777-6784.
- Makarova, J. A., M. U. Shkurnikov, D. Wicklein, T. Lange, T. R. Samatov, A. A. Turchinovich and A. G. Tonevitsky (2016). "Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role." Prog Histochem Cytochem.
- Malkewitz, A., O. Makarewicz, K. Kentouche, P. Keller, M. Karrasch and M. W. Pletz (2014). "Epstein-Barr Virus MicroRNAs in plasma as potential biomarkers for chronic infections: (response to: Kawano et al; The Journal of Infectious Diseases; 2013; 208:771-9)." J Infect Dis **209**(8): 1297-1298.
- Meckes, D. G., Jr., H. P. Gunawardena, R. M. Dekroon, P. R. Heaton, R. H. Edwards, S. Ozgur, J. D. Griffith, B. Damania and N. Raab-Traub (2013). "Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(31): E2925-2933.
- Merhautova, J., R. Demlova and O. Slaby (2016). "MicroRNA-Based Therapy in Animal Models of Selected Gastrointestinal Cancers." Front Pharmacol **7**: 329.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.
- Monroig-Bosque Pdel, C., C. A. Rivera and G. A. Calin (2015). "MicroRNAs in cancer therapeutics: "from the bench to the bedside"." Expert Opin Biol Ther **15**(10): 1381-1385.
- Moon, J. S., S. H. Lee, S. H. Han, E. J. Kim, H. Cho, W. Lee, M. K. Kim, T. E. Kim, H. J. Park, J. K. Rhee, S. J. Kim, S. W. Cho, S. H. Han and J. W. Oh (2016). "Inhibition of hepatitis C virus in mouse models by lipidoid nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA against PRK2." Nanomedicine **12**(6): 1489-1498.
- Nachmani, D., N. Stern-Ginossar, R. Sarid and O. Mandelboim (2009). "Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells." Cell Host Microbe **5**(4): 376-385.
- Nowalk, A. and M. Green (2016). "Epstein-Barr Virus." Microbiol Spectr **4**(3).
- Ono, K., T. Sato, S. Iyama, A. Tatekoshi, A. Hashimoto, Y. Kamihara, H. Horiguchi, S. Kikuchi, Y. Kawano, K. Takada, T. Hayashi, K. Miyanishi, Y. Sato, R. Takimoto, M. Kobune and J. Kato (2014). "A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin." Blood Cancer J **4**: e180.
- Park, H. J., E. J. Jeon, J. S. Lee, S. H. Hong, A. N. Cho, J. Lee, J. S. Moon, K. E. Jung, J. W. Oh, H. Lee and S. W. Cho (2016). "Galactosylated Lipidoid Nanoparticles for Delivery of Small Interfering RNA to Inhibit Hepatitis C Viral Replication In Vivo." Adv Healthc Mater.

- Pegtel, D. M., K. Cosmopoulos, D. A. Thorley-Lawson, M. A. van Eijndhoven, E. S. Hopmans, J. L. Lindenberg, T. D. de Gruijl, T. Wurdinger and J. M. Middeldorp (2010). "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6328-6333.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, F. A. Grasser, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander and T. Tuschl (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science **304**(5671): 734-736.
- Ramalingam, D., P. Kieffer-Kwon and J. M. Ziegelbauer (2012). "Emerging themes from EBV and KSHV microRNA targets." Viruses **4**(9): 1687-1710.
- Rickinson, A. B. K., E (2007). Epstein-Barr Virus. Fields Virology. D. M. H. Knipe, P. M. New York, Lippincott, Williams and Wilkins: 2655-2700.
- Robertson, P., S. Beynon, R. Whybin, C. Brennan, U. Vollmer-Conna, I. Hickie and A. Lloyd (2003). "Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection." J Med Virol **70**(4): 617-623.
- Seiffert, M., S. Stilgenbauer, H. Dohner and P. Lichter (2007). "Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids." Leukemia **21**(9): 1977-1983.
- Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nat Biotechnol **26**(10): 1135-1145.
- Song, Y., X. Li, Z. Zeng, Q. Li, Z. Gong, Q. Liao, X. Li, P. Chen, B. Xiang, W. Zhang, F. Xiong, Y. Zhou, M. Zhou, J. Ma, Y. Li, X. Chen, G. Li and W. Xiong (2016). "Epstein-Barr virus encoded miR-BART11 promotes inflammation-induced carcinogenesis by targeting FOXP1." Oncotarget.
- Tagawa, T., M. Albanese, M. Bouvet, A. Moosmann, J. Mautner, V. Heissmeyer, C. Zielinski, D. Lutter, J. Hoser, M. Hastreiter, M. Hayes, B. Sugden and W. Hammerschmidt (2016). "Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing." J Exp Med **213**(10): 2065-2080.
- Taylor, A. L., R. Marcus and J. A. Bradley (2005). "Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation." Crit Rev Oncol Hematol **56**(1): 155-167.
- Tsai, C. Y., Y. Y. Liu, K. H. Liu, J. T. Hsu, T. C. Chen, C. T. Chiu and T. S. Yeh (2016). "Comprehensive profiling of virus microRNAs of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma-- highlighting the interactions of ebv-Bart9 and host tumor cells." J Gastroenterol Hepatol.
- Turchinovich, A., A. G. Tonevitsky and B. Burwinkel (2016). "Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms." Trends Biochem Sci.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-659.
- van Rooij, E. (2011). "The art of microRNA research." Circ Res **108**(2): 219-234.
- Varkonyi-Gasic, E., R. Wu, M. Wood, E. F. Walton and R. P. Hellens (2007). "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs." Plant Methods **3**: 12.

- Wagner, E. (2015). "Tumor-targeted Delivery of Anti-microRNA for Cancer Therapy: pHLP is Key." Angew Chem Int Ed Engl **54**(20): 5824-5826.
- Wang, H., Y. Wang, Q. Du, P. Lu, H. Fan, J. Lu and R. Hu (2016). "Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells." Exp Cell Res **342**(2): 184-192.
- Weber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas and K. Wang (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-1741.
- Xia, T., A. O'Hara, I. Araujo, J. Barreto, E. Carvalho, J. B. Sapucaia, J. C. Ramos, E. Luz, C. Pedroso, M. Manrique, N. L. Toomey, C. Brites, D. P. Dittmer and W. J. Harrington, Jr. (2008). "EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3." Cancer Res **68**(5): 1436-1442.
- Xing, L. and E. Kieff (2007). "Epstein-Barr virus BHRF1 micro- and stable RNAs during latency III and after induction of replication." J Virol **81**(18): 9967-9975.
- Yang, H. J., T. J. Huang, C. F. Yang, L. X. Peng, R. Y. Liu, G. D. Yang, Q. Q. Chu, J. L. Huang, N. Liu, H. B. Huang, Z. Y. Zhu, C. N. Qian and B. J. Huang (2013). "Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus-encoded miRNA species associated with specific latency types in tumor cells." Virol J **10**: 314.
- Yu, B., Y. Mao, Y. Yuan, C. Yue, X. Wang, X. Mo, D. Jarjoura, M. E. Paulaitis, R. J. Lee, J. C. Byrd, L. J. Lee and N. Muthusamy (2013). "Targeted drug delivery and cross-linking induced apoptosis with anti-CD37 based dual-ligand immunoliposomes in B chronic lymphocytic leukemia cells." Biomaterials **34**(26): 6185-6193.
- Zhang, G., J. Zong, S. Lin, R. J. Verhoeven, S. Tong, Y. Chen, M. Ji, W. Cheng, S. W. Tsao, M. Lung, J. Pan and H. Chen (2015). "Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment." Int J Cancer **136**(5): E301-312.
- Zheng, X. H., L. X. Lu, C. Cui, M. Y. Chen, X. Z. Li and W. H. Jia (2016). "Epstein-Barr virus mir-bart1-5p detection via nasopharyngeal brush sampling is effective for diagnosing nasopharyngeal carcinoma." Oncotarget **7**(4): 4972-4980.
- Zhou, C., Z. Xie, L. Gao, C. Liu, J. Ai, L. Zhang and K. Shen (2015). "Profiling of EBV-Encoded microRNAs in EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis." Tohoku J Exp Med **237**(2): 117-126.
- Zhou, S., D. Wu, X. Yin, X. Jin, X. Zhang, S. Zheng, C. Wang and Y. Liu (2017). "Intracellular pH-responsive and rituximab-conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to lymphoma B cells." J Exp Clin Cancer Res **36**(1): 24.

9. Anhang

9.1. Zusammenfassung der Studienrohdaten

Tabelle 16: Zusammenfassung aller Daten der EBV-Studie. E = Erstinfektion, R = Reaktivierung, ST = symptomlose Träger, SN =seronegativ, U = unbekannt, nd = nicht detektiert

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
009	0	ST	9,01	nd	nd	31,62	nd	25,43	nd	nd	25,93	nd	nd	nd
010	13000	R	9,09	30,37	nd	30,37	nd	24,61	nd	nd	25,44	nd	nd	nd
011	5600	R	11,19	nd	nd	31,44	nd	24,47	nd	30,34	25,53	nd	nd	nd
012	48000	R	8,70	nd	nd	30,30	32,49	23,66	nd	25,74	25,15	nd	nd	nd
014	110000	E	12,98	22,17	nd	29,49	nd	23,35	nd	28,70	33,75	nd	nd	nd
015	4300000	E	9,16	23,50	nd	30,06	nd	24,80	31,86	19,39	29,71	nd	nd	nd
016	16000	R	10,77	nd	nd	29,81	nd	23,48	nd	29,12	24,59	nd	nd	nd
018	0	ST	11,33	32,28	nd	32,02	nd	31,39	nd	21,88	25,60	nd	nd	nd
019	0	ST	8,99	nd	nd	nd	nd	nd	nd	30,93	nd	nd	nd	nd
020	0	ST	9,18	nd	nd	30,76	30,50	23,42	nd	nd	20,83	nd	nd	nd
021	1900000	E	8,95	16,30	nd	16,12	17,76	14,11	17,78	13,42	14,90	nd	18,79	nd
022	2800	R	9,82	nd	nd	nd	nd	30,93	nd	nd	29,07	nd	nd	nd
023	1100000	E	9,03	30,26	nd	21,94	30,51	21,38	nd	27,16	19,76	nd	nd	nd
028	7700	R	9,46	nd	nd	nd	nd	28,06	nd	nd	21,07	nd	nd	nd
029	0	ST	8,84	nd	nd	nd	nd	22,94	nd	nd	20,37	nd	nd	nd
032	76000	R	9,40	nd	nd	27,07	nd	23,27	nd	nd	28,84	nd	nd	nd

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
033	160000	R	9,45	nd	nd	27,43	30,14	23,98	nd	nd	24,83	nd	nd	nd
034	0	ST	9,66	nd	nd	23,18	nd	25,06	nd	nd	29,00	nd	nd	nd
036	0	ST	9,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,61	nd	nd	nd	nd
037	0	ST	9,36	nd	nd	23,38	nd	24,56	nd	nd	29,03	nd	nd	nd
038	0	ST	9,15	nd	nd	27,77	nd	24,64	nd	nd	29,06	nd	nd	nd
039	357	R	10,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
040	0	ST	9,91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
041	52000	R	9,34	nd	nd	22,07	nd	23,39	nd	nd	28,85	nd	nd	nd
042	140000	R	11,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
043	0	ST	11,34	nd	nd	nd	nd	25,84	nd	nd	29,11	nd	nd	nd
044	0	ST	7,80	nd	nd	26,79	31,41	27,14	28,73	17,26	31,59	nd	31,86	nd
045	0	ST	8,36	30,54	nd	30,80	nd	31,05	nd	21,34	29,23	nd	nd	nd
046	2240	R	9,92	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,43	30,20	nd	nd	nd
047	0	ST	7,84	nd	nd	nd	nd	31,41	nd	30,00	nd	nd	nd	nd
048	17000	R	6,86	nd	nd	31,66	nd	31,55	nd	30,65	nd	nd	nd	nd
049	0	ST	8,92	nd	nd	23,96	nd	23,71	nd	nd	20,80	nd	nd	nd
050	0	ST	8,93	32,87	nd	24,47	nd	24,78	nd	29,67	33,27	nd	nd	nd
051	40000	R	9,79	23,86	nd	23,39	nd	23,05	nd	20,00	32,73	nd	nd	nd
053	0	ST	9,26	34,93	nd	25,90	33,20	32,61	nd	29,80	32,57	nd	nd	nd
054	0	ST	10,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
056	0	ST	9,50	32,54	nd	24,70	nd	23,80	nd	29,74	32,89	nd	nd	nd
057	0	ST	9,73	29,95	nd	27,29	32,14	29,46	nd	29,15	nd	nd	nd	nd
058	700000	E	9,79	23,49	nd	19,69	nd	22,12	nd	17,52	20,74	nd	nd	nd
059	3130	R	9,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20,23	nd	nd	nd

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
060	120000	R	9,13	nd	nd	nd	nd	31,20	nd	nd	19,29	nd	nd	nd
061	2000000	E	9,86	23,63	nd	nd	nd	22,50	nd	nd	31,81	nd	nd	nd
062	720	R	9,28	22,73	nd	21,53	29,35	22,38	28,09	25,55	25,37	nd	30,74	nd
064	810000	E	8,78	20,61	nd	17,99	23,45	18,06	20,19	14,83	21,20	nd	28,61	nd
065	32000	E	11,08	23,45	nd	21,95	25,68	24,01	24,63	19,70	30,40	nd	nd	nd
066	660000	R	11,09	34,51	nd	23,47	27,58	25,67	33,45	20,98	31,78	nd	nd	nd
067	30000	R	9,56	nd	nd	29,87	nd	23,76	nd	nd	23,64	nd	nd	nd
068	5200	R	10,27	24,75	nd	27,42	34,65	28,00	nd	nd	32,70	nd	nd	nd
069	540000	E	10,39	nd	nd	25,17	nd	29,75	nd	22,46	nd	nd	nd	nd
070	0	ST	10,67	28,28	nd	28,25	33,91	34,35	nd	nd	31,81	nd	nd	nd
072	0	ST	9,74	nd	nd	nd	nd	31,57	nd	nd	23,67	nd	nd	nd
073	500000	E	10,20	25,05	nd	23,36	19,88	25,86	24,94	20,94	28,63	nd	nd	nd
074	192000	R	9,35	31,40	nd	23,40	nd	20,76	nd	25,58	22,11	nd	nd	nd
075	10000	R	9,17	nd	nd	nd	nd	22,11	nd	nd	21,81	nd	nd	nd
076	1330	U	10,15	27,05	nd	nd	33,38	34,02	nd	nd	29,25	nd	nd	nd
077	13000	R	7,54	29,67	nd	28,17	35,40	27,38	nd	nd	32,32	nd	nd	nd
078	110000	E	7,30	29,67	nd	29,29	33,87	28,87	nd	20,55	30,67	nd	36,60	nd
080	570000	E	7,20	21,69	nd	21,14	26,77	22,20	28,39	17,82	27,80	nd	35,01	nd
081	0	ST	7,18	30,06	nd	29,89	36,51	30,02	nd	nd	28,21	nd	nd	nd
082	860	R	6,93	30,72	nd	32,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
083	3100	R	7,04	33,83	nd	31,95	35,76	28,03	nd	nd	35,06	nd	nd	nd
084	2100000	E	12,44	18,62	nd	17,10	16,69	17,53	14,70	15,01	18,41	nd	29,35	nd
085	0	SN	12,55	nd	nd	nd	nd	26,78	nd	nd	23,27	nd	nd	nd
086	480000	E	14,10	22,05	nd	21,00	30,58	20,73	17,85	18,28	20,81	nd	30,20	nd

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
087	70000	E	12,27	30,32	nd	24,20	nd	23,19	nd	nd	22,72	nd	nd	nd
088	120000	E	12,25	30,43	nd	21,56	30,19	21,19	nd	19,65	21,30	nd	nd	nd
089	95100	E	12,22	nd	nd	nd	nd	30,14	nd	nd	22,60	nd	nd	nd
090	62000	E	12,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,58	nd	nd	nd
091	22000	E	10,58	nd	nd	23,89	nd	23,75	nd	nd	26,27	nd	nd	nd
092	448000	E	10,34	22,41	nd	19,74	23,67	18,79	30,82	17,87	23,89	nd	nd	nd
093	4000000	E	10,29	22,72	nd	22,47	nd	21,76	nd	19,52	24,43	nd	nd	nd
094	15000	U	10,14	nd	nd	23,90	nd	23,33	nd	nd	26,17	nd	nd	nd
095	240000	U	10,26	21,54	nd	20,96	nd	20,18	31,54	18,49	23,95	nd	nd	nd
096	17000	R	10,52	nd	nd	25,02	nd	23,59	nd	nd	25,40	nd	nd	nd
097	0	ST	10,34	22,50	nd	23,65	nd	23,91	nd	nd	26,31	nd	nd	nd
098	336	R	7,82	nd	nd	nd	nd	22,99	nd	nd	18,72	nd	nd	nd
099	2880	R	7,69	nd	nd	nd	nd	22,89	nd	nd	18,49	nd	nd	nd
100	3680	R	7,57	nd	nd	nd	nd	22,80	nd	nd	18,63	nd	nd	nd
101	50200	R	7,51	nd	nd	nd	nd	21,72	nd	nd	18,63	nd	nd	nd
102	5200	R	9,44	nd	nd	nd	nd	30,25	32,83	nd	23,32	nd	nd	nd
103	3300	R	9,29	nd	nd	nd	nd	21,99	nd	nd	22,56	nd	nd	nd
104	630	R	9,33	nd	nd	nd	nd	22,43	nd	nd	22,58	nd	nd	nd
105	0	ST	9,24	nd	nd	nd	nd	30,03	nd	nd	22,62	nd	nd	nd
106	34000	R	9,22	nd	nd	23,24	nd	21,02	nd	nd	22,09	nd	nd	nd
107	2400	R	9,17	nd	nd	22,99	nd	21,58	nd	nd	22,23	nd	nd	nd
108	31000	E	9,30	nd	nd	22,43	29,52	21,37	31,46	nd	22,12	nd	nd	nd
109	190000	R	9,49	nd	nd	21,67	28,62	23,86	31,87	25,69	24,64	nd	nd	nd
110	0	ST	10,01	nd	nd	nd	nd	25,84	nd	nd	24,55	nd	nd	nd

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
111	0	ST	10,01	nd	nd	nd	nd	26,54	nd	nd	24,80	nd	nd	nd
112	36800	E	9,92	nd	nd	23,28	28,93	25,47	32,85	29,79	24,25	nd	nd	nd
113	8100	E	9,53	nd	nd	22,56	32,19	24,69	27,17	20,58	23,80	nd	nd	nd
114	64000	E	9,58	nd	nd	20,94	22,89	23,64	25,44	19,72	23,11	nd	nd	nd
115	12000000	E	9,90	16,52	nd	14,04	16,36	15,97	18,00	14,16	16,88	nd	18,06	nd
116	0	ST	8,45	nd	nd	25,83	nd	23,92	31,61	nd	20,25	nd	nd	nd
117	310000	E	8,21	29,17	nd	19,74	nd	18,94	28,72	16,88	16,89	nd	27,94	nd
118	83300	E	7,84	nd	nd	29,59	nd	21,55	nd	27,74	18,19	nd	nd	nd
119	192000	E	9,28	nd	nd	19,77	28,10	20,62	21,22	17,25	17,92	nd	19,94	nd
120	110000	R	8,61	23,06	nd	21,52	nd	nd	nd	28,10	29,15	nd	nd	nd
121	0	ST	8,77	nd	nd	21,99	nd	nd	nd	28,13	19,51	nd	nd	nd
122	0	ST	8,70	22,56	nd	20,84	nd	nd	nd	28,10	19,53	nd	nd	nd
123	0	SN	8,71	nd	nd	nd	nd	32,76	nd	28,05	19,78	nd	nd	nd
124	110	U	9,35	nd	nd	nd	nd	26,43	nd	nd	20,10	nd	nd	nd
125	79	U	9,40	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,88	nd	nd	nd
126	0	ST	9,53	nd	nd	nd	nd	25,09	nd	nd	20,59	nd	nd	nd
127	545000	R	9,10	21,14	nd	18,59	32,90	19,76	20,58	16,61	16,60	nd	nd	nd
128	110	R	9,09	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,76	nd	nd	nd
129	0	ST	8,99	nd	nd	nd	nd	31,42	nd	nd	20,17	nd	nd	nd
130	1200	U	9,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	19,76	nd	nd	nd
131	0	ST	8,41	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,96	nd	nd	nd
132	0	ST	8,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,99	nd	nd	nd
133	1300	R	8,36	nd	nd	nd	nd	31,99	nd	nd	28,74	nd	nd	nd
134	65000	E	8,68	nd	nd	30,00	nd	31,29	nd	nd	28,47	nd	nd	nd

Proband	Viruslast Kopien/ml	Gruppe	Ct-Werte											
			mir-16	BHRF 1-1	BHRF 1-2	BART 1-5p	BART 2-5p	BART 5-5p	BART 6-5p	BART 7-3p	BART 9-3p	BART 13-3p	BART 15-3p	BART 20-5p
135	8830	E	8,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,86	nd	nd	nd
136	600000	E	8,08	29,64	nd	17,14	31,81	18,43	27,79	15,10	26,66	nd	nd	nd
137	34700	R	8,07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,83	nd	nd	nd
138	0	SN	7,45	nd	nd	27,94	nd	nd	nd	nd	23,20	nd	nd	nd
139	350000	E	7,76	nd	nd	14,93	23,30	16,77	17,77	12,97	18,20	nd	19,67	nd
140	0	SN	7,53	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22,81	nd	nd	nd
141	7500	R	7,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22,62	nd	nd	nd
142	428000	E	7,46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
143	0	ST	7,46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22,08	nd	nd	nd
144	47000	E	7,32	nd	nd	18,92	32,11	20,89	21,27	16,17	21,16	nd	nd	nd
145	88000	U	8,74	nd	nd	23,46	nd	25,62	nd	19,64	25,37	nd	nd	nd
146	0	ST	8,10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
147	711000	R	8,60	nd	nd	20,92	28,21	21,71	23,19	17,50	23,19	nd	nd	nd
151	0	SN	8,39	nd	nd	29,66	nd	nd	nd	28,52	31,19	nd	nd	nd
152	0	SN	8,50	nd	nd	29,87	nd	nd	nd	28,55	31,21	nd	nd	nd
153	0	SN	8,12	nd	nd	29,56	nd	nd	nd	28,57	31,24	nd	nd	nd
154	0	SN	8,17	nd	nd	29,69	nd	nd	nd	28,53	31,05	nd	nd	nd
155	0	SN	8,15	nd	nd	29,29	nd	nd	nd	28,50	30,91	nd	nd	nd
156	0	SN	7,89	nd	nd	29,22	nd	nd	nd	28,48	31,08	nd	nd	nd
157	0	SN	8,02	nd	nd	28,57	nd	nd	nd	28,42	31,28	nd	nd	nd
158	0	SN	10,38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,43	nd	nd	nd
161	0	SN	10,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,30	nd	nd	nd
162	0	SN	10,37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,37	nd	nd	nd

9.2. Transfektionsdaten

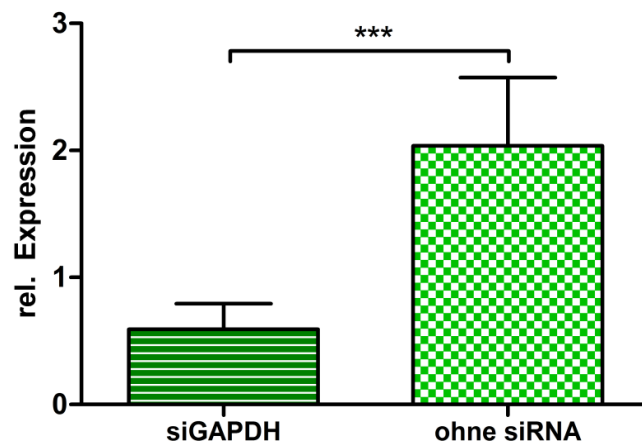


Abbildung 25: Effekt der Transfektion von verschiedener siRNA auf die GAPDH-Expression. Übertragen wurde die siRNA mittels Elektroporation bei 1600 V für 20 ms. Als endogene Referenz diente 18s RNA und die Ergebnisse wurden auf eine Kontrolle ohne Elektroporation normalisiert. Die statistische Auswertung der Mittelwerte erfolgte über einen Mann-Whitney U-Test (95 % Konfidenzintervall).

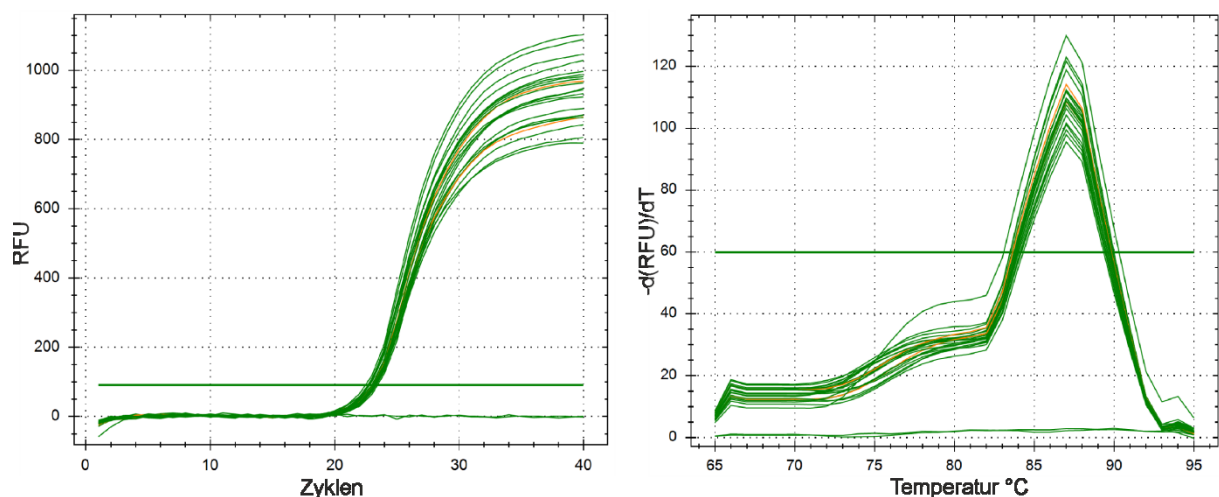


Abbildung 26: Nachweis der EBV-Protease BVRF2-mRNA in transfezierten Zellen. Überprüft wurden sowohl die Proben bei denen die AGAP-siRNA mit und ohne gekoppeltem Peptid übertragen wurde, als auch unbehandelte EBV-infizierte B-Zellen als Positivkontrolle (orange). Die waagerechte grüne Linie definiert den Schwellenwert.

9.3. Ethikantrag

Absender: Prof. Dr. med. Mathias Pletz / Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz
 Universitätsklinikum Jena, Forschungslabor
 Zentrum für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene
 Erlanger Allee 101, 07747 Jena

Antrag

an die Ethik-Kommission der FSU Jena zur Durchführung von Forschung an humanem Körperflüssigkeiten

1. Bezeichnung der Studie / Titel:

Nachweis von EBV miRNA in humanem Blutplasma

2. Ziel der Studie:

Das Epstein-Barr Virus ist ein g-Herpesvirus, das nahezu in 98 % der Weltbevölkerung persistiert [1] und zur Ausbildung von Karzinomen und der seltenen und tödlichen Hämophagocytose führen kann. Seit ca. 2004 wurden 25 EBV-kodierende microRNAs (in zwei Clustern: BART und BHRF1) nachgewiesen, die für die Regulation der eigenen und der Wirtsgene verantwortlich sind. Dabei werden die im BHRF1-Cluster codierenden miRNAs zum Teil nur während der lytischen Erstinfektion (miR-BHRF1-1) aber auch verstärkt während der lytischen Reaktivierung (miR-BHRF1-2 und 1-3) gebildet. Außerdem hemmen diese miRNAs die T-Zell-spezifische Rezeptoren (miR-BHRF1-3), die für die Interferonausschüttung verantwortlich sind sowie die NK-Zell-spezifischen Erkennung der befallenen Zellen (BART3-5p miRNA). Neuesten Studien zufolge werden diese microRNAs auch über Exosomen aus den Zellen sezerniert und können von nicht-infizierten Zellen aufgenommen werden, wo sie ebenfalls EBV-spezifische Genregulation verursachen [2, 3].

Im Rahmen dieser vorerst auf ein Jahr ausgelegten Studie sollen der Nachweis von exosomal-sezernierten BHRF1- und die BART- miRNAs in Patientenmaterial (Blutplasma) durchgeführt und die experimentellen Bedingungen für einen zuverlässigen Nachweis optimiert werden. Ziel der Versuche ist die Etablierung der sekretierten EBV-microRNA als diagnostischer Marker.

3. Ärztlicher / Wissenschaftlicher Leiter der Studie:

Für lokale Studie:

Titel; Vorname, Name: Prof. Dr. Mathias Pletz, Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz
 Klinik/Institution: Zentrum für Infektionskrankheiten und Krankenhaushygiene
 Forschungslabor Klinische Infektiologie
 Telefon-Nummer: 03641 / 9 324227
 E-Mail: oliwia.makarewicz@med.uni-jena.de

4. Mitwirkende Ärzte / Wissenschaftler:

Titel; Vorname, Name: Dr. med. Peter Keller
 Klinik/Institution: Universitätslaboratorien, Institut für Medizinische Mikrobiologie
 Telefon-Nummer: 03641 / 9 39 36 10
 E-Mail: peter.keller@uni-jena.de

Titel; Vorname, Name: Dr. med. Karim Kentouche
 Klinik/Institution: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
 Telefon-Nummer: 03641 / 9 38 42 6
 E-Mail: karim.kentouche@uni-jena.de

5. Wer finanziert die Studie?

- ☒ Hausmittel
☐ öffentliche Mittel DFG ☐ / BMBF ☐ / IZKF / ☐ / EU ☐
☐ Stiftungen
☐ Industrie Rechnungsanschrift:

6. Art, Umfang und Herkunft der Asservate

Patienten mit Diagnose EBV-Reaktivierung (n = 40) und EBV-Erstinfektion (n=40) werden einmalig je **10 mL EDTA-Blut** entnommen. Da die EBV-Infektionen auch bei Kindern und Jugendlichen ein Problem darstellen kann, werden bei Kindern älter als 4 Jahre nach Aufklärung durch den behandelnden Pädiater bei einer ohnehin stattfindenden Blutentnahme auch **10 mL Blut** entnommen. Gesunden volljährigen Probanden (n = 40) wird ebenfalls einmalig **10 mL EDTA-Blut** entnommen.

7. Geplante Beginn der Studie**August 2012****8. Voraussichtliches Ende der Studie****Dezember 2012****9. Liegen zu der geplanten Studie bereits vor**

- 9.1. Labor- (in-vitro-)Versuche** ☒
9.2. Tierversuche ☐
9.3. Untersuchungen am Menschen ☐
 Literaturkurzfassung in der Anlage Ja ☒ Nein ☐

10. Liegt oder lag die Studie in dieser oder ähnlicher Form einer anderen Ethik-Kommission bereits vor?

- Nein ☒
 Ja ☐ *Eine Kopie des Votums als Anlage bitte beifügen!*
 Bewertung: positiv ☐ negativ ☐

Wenn negativ warum?

11. Kurze Darstellung der geplanten Versuchsanordnung

Der Probanden werden 1 mal (eine Punktion) 10 ml Blut entnommen und durch Zentrifugation in Plasma, ‚buffy coat‘ und Erythrozyten-Fraktion getrennt. Aus dem Plasma und dem ‚buffy coat‘ wird jeweils die Gesamt-RNA isoliert und die EBV-spezifische micro-RNA mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Ferner werden auch Kontrollen auf Anwesenheit von EBV-DNA und Wirts-DNA durchgeführt, die Indikatoren für die B-Lymphozyten darstellen und damit den Verunreinigungsgrad des Plasmas abbilden sollen.

Als Nachweismethoden werden Northern- und Dot-Blotts durchgeführt und modifizierte PCR-basierte Verfahren entwickelt. Die Detektion soll mittels Fluoreszenz-markierter Sonden erfolgen. Abgesehen von

dem EBV—Titer und dem Nachweis der microRNA werden keine weiteren Parameter erhoben. Die Studie wird pseudoanonymisiert durchgeführt.

Datum:

.....
Unterschrift und Stempel
des Leiters der Studie

Datum:

.....
Unterschrift und Stempel
des Instituts-/Klinikdirektors
Leiter der Einrichtung

Zustimmung des Instituts-/Klinikdirektors eventuell weiterer beteiligter Einrichtungen:

Datum:

.....
Unterschrift und Stempel
des Instituts-/Klinikdirektors
Leiter der Einrichtung

Datum:

.....
Unterschrift und Stempel
des Instituts-/Klinikdirektors
Leiter der Einrichtung

Jedem Antrag ist ein auf einem Kopfbogen der durchführenden Einrichtung geschriebenes Exemplar der Patienteninformation/Einwilligungserklärung beizufügen.

Anhang 1: Literaturverzeichnis

1. Hislop, A.D., et al., *Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 587-617.
2. Gibbins, D.J., et al., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1143-9.
3. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6328-33.

9.4. Chronologischer Verlauf der Studie

August 2012	Antrag und Bewilligung der Studie
November 2012	Einschluss der Klinik für Innere Medizin II (UKJ) als zusätzlich mitwirkende Station und Verlängerung der Studie bis Dezember 2013
September 2013	Verlängerung der Studie bis Dezember 2015
Juni 2014	Erweiterung des Untersuchungspanels auf CMV-miRNA und Einschluss des Instituts für Virologie und Antivirale Therapie (UKJ) Verlängerung der Studie bis Dezember 2016
November 2016	Einschluss der Klinik für Kinderchirurgie (UKJ) als zusätzlich mitwirkende Station und Verlängerung der Studie bis Juli 2017

9.5. Patientenaufklärung

Zentrum für Infektionskrankheiten und
Krankenhaushygiene

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Medizinische Universitätslaboratorien

Leiter: Prof. Dr. Mathias Pletz



Universitätsklinikum Jena
Erlanger Allee 101
07747 Jena

Jena, 18/ August 2014

Probandenaufklärung / Einwilligungserklärung

Studie: Nachweis von EBV und CMV miRNA in humanem Blutplasma

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir freuen uns sehr über Ihr Interesse an der Studie „Nachweis von EBV und CMV miRNA in humanem Blutplasma“. Dieses Schreiben soll Sie mit dem Ablauf und dem Ziel der Studie vertraut machen.

Wir bitten Sie dieses Informationsschreiben aufmerksam zu lesen.

Kurze Einleitung: Das Epstein-Barr Virus (EBV) infiziert nahezu 98 % der Weltbevölkerung. Infektionen verlaufen in der Regel symptomlos oder durch die Ausprägung einer Infektösen Mononukleose („Pfeiffersches Drüsenfieber“). In seltenen Fällen kann es zur Ausbildung von Karzinomen oder der sehr seltenen und tödlichen Hämophagocytose führen.

Das Zytomegalievirus (CMV) ist das größte Humanvirus und tritt in Abhängigkeit von Alter, sozialer Herkunft und Bevölkerungsdichte mit einer Häufigkeit von 30-90% auf. Infektionen verlaufen in der Regel symptomlos. Von großer Bedeutung ist dieses Virus hauptsächlich bei Patienten mit einer Immunschwäche und besonders in der Schwangerschaft. Hier stellt es die häufigste Ursache von Virusinfektionen dar.

Beide Viren zählen zur Gruppe der Herpesviren, das bedeutet, dass sie nach der Infektionen lebenslang im Körper verbleiben. Hier können sie dann bei Stress oder anderen Vorerkrankungen wieder aktiv werden und erneut Symptome hervorrufen. Vor einigen Jahren fanden Forscher heraus, dass EBV und CMV kleine regulatorische Moleküle, s. g. „microRNAs“ produzieren, welche bis dahin nur in höheren Lebewesen nachgewiesen werden konnten. Durch die microRNAs kann das Virus auf das menschliche Immunsystem Einfluss nehmen. Ziel dieser Studie ist es deshalb, die viralen microRNAs in den verschiedenen Phasen der Infektion zu identifizieren und damit einen Ansatz für eine neue Art der Therapie zu ermöglichen.

Ablauf: Allen Patienten wird an einem vereinbarten Termin 9 mL Blut entnommen. Aus dem Vollblut wird Gesamt-RNA isoliert und anschließend die microRNA viralen

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00
Internet: www.uniklinikum-jena.de
Gerichtsstand Jena
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777
Bankverbindung:
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel
Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstands:
Prof. Dr. Klaus Höfken
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

Ursprungs nachgewiesen. Anhand der gewonnenen Daten sollen microRNA-Muster identifiziert und analysiert werden.

Vorteile: Sie haben die Möglichkeit über die Ergebnisse Ihrer Blutuntersuchung informiert zu werden. Bitte teilen Sie uns mit, ob Sie Ihr Testergebnis erfahren möchten. Wir bieten Ihnen an, Sie in einem Beratungsgespräch über das Ergebnis dieser Untersuchung zu informieren. Wir sind selbstverständlich bereit, alle Befunde an einen Facharzt bzw. Institut Ihrer Wahl weiterzuleiten. Untersuchungsergebnisse werden ohne Ihren ausdrücklichen Wunsch **nicht** an Angehörige, Ihren Hausarzt oder Behörden und Versicherungen weitergeleitet.

Risiken: Es bestehen die Risiken einer venösen Blutentnahme. Das Vorgehen bei der Blutentnahme entspricht der üblichen Routine wie Sie es vielleicht vom Hausarzt oder Krankenhaus kennen. Das Blut wird in der Regel aus einer Vene in der Armbeuge oder am Handrücken entnommen. Außer einem kurzen Schmerz beim Einstich der Nadel kann es gelegentlich zu einer leichten Einblutung mit nachfolgendem Bluterguss („blauer Fleck“) kommen, der innerhalb weniger Tage verschwindet. Manche Personen reagieren auch auf eine kleine Blutentnahme mit einer Kreislaufreaktion. Um dies zu vermeiden, erfolgt die Blutentnahme bevorzugt im Liegen. Selbstverständlich wird das Personal entsprechende Maßnahmen ergreifen (z.B. Hochlagern der Beine), falls bei Ihnen eine Kreislaufreaktion auftritt. Andere Risiken der Blutentnahme wie Infektion, Thrombosierung oder die Verletzung von benachbartem Gewebe und Nerven durch die Blutentnahmenadel sind bei einmaliger Blutentnahme sehr selten und bei geschultem Personal so gut wie ausgeschlossen. Bitte verzichten Sie auf eine Teilnahme bei bekannten Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Freiwilligkeit der Teilnahme, Rücktrittsrecht ohne nachteilige Folgen: Diese Studie ist freiwillig. Ihr Einverständnis können Sie jederzeit und ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile widerrufen. Falls Sie von der Studie zurücktreten, werden alle bis dahin erhobenen Daten und Proben vernichtet. Falls Sie mit einer Teilnahme einverstanden sind, bitten wir Sie, die Einverständniserklärung zu unterzeichnen. Die Unterzeichnung dieser Einverständniserklärung beeinträchtigt nicht Ihre normalen Rechte. Hinsichtlich des Versicherungsschutzes werden Sie vorsorglich darauf hingewiesen, dass Sie für Gesundheitsschäden oder sonstige Beeinträchtigungen, die bei Ihnen im Zusammenhang mit der Teilnahme an dieser Studie auftreten, ohne dass den Arzt oder seine Erfüllungsgehilfen (z.B. Mitarbeiter) ein schuldhaftes Fehlverhalten trifft (z.B. auch für Wegeunfälle), nicht versichert sind.

Wirtschaftliche Aspekte: Im Rahmen der Studienteilnahme erhalten Sie kein Honorar. Sie können jedoch indirekt über einen möglichen Nutzen für die Allgemeinheit profitieren. Alle aus dieser Studie hervorgehenden wissenschaftlichen Erkenntnisse und der damit möglicherweise verbundene wirtschaftliche Nutzen, wie beispielsweise die Entwicklung neuer Konzepte, Diagnostika oder Medikamente, verbleiben in Übereinstimmung mit der beiliegenden Einverständniserklärung bei den Partnern der Forschungs Kooperation. Auf Wunsch erhalten Sie kostenlos Auskunft über Sie betreffende Studienergebnisse (EBV-/CMV-Test) und/oder über die anonymisierten wissenschaftlichen Studienergebnisse. Eine Teilnahme an der Studie ist für Sie kostenlos.

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 0364 1 93 00
Internet: www.uniklinikum-jena.de
Gerichtsstand Jena
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777
Bankverbindung:
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel
Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstands:
Prof. Dr. Klaus Höfken
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

Datenschutz (personenbezogene Daten):

Im Rahmen der Studie werden Ihre Daten kodiert, d.h. die persönlichen Daten wie z.B. Ihr Name und Ihre Adresse werden strikt von den Untersuchungsdaten (Labordaten) getrennt. Durch diese Kodierung wird im Rahmen der wissenschaftlichen Auswertung kein Unbefugter ihre persönlichen Daten erhalten. Probenmaterial und medizinische Daten werden nur mit Kodenummer versehen weitergeleitet. Die Zuordnung ihrer persönlichen Daten zu der Kodenummer ist nur dem leitenden Studienarzt am Universitätsklinikum Jena möglich. Sie wird entsprechend den gesetzlichen Vorschriften für medizinische Daten und der ärztlichen Schweigepflicht unter keinen Umständen an andere Personen weitergegeben. Eine Wiederherstellung der persönlichen Daten aus der Kodenummer ist nur für den besonderen Fall vorgesehen, dass eine zuständige Überwachungsbehörde, Bundesoberbehörde oder Ethikkommission dieses fordert. Aufgrund der Kodierung Ihrer Daten vor Durchführung der Laboranalysen ist jede Zusammenführung von Laborergebnissen mit ihren persönlichen Daten ausgeschlossen.

Datenschutz:

- ☐ Ich erkläre, dass ich mit der im Rahmen der klinischen Prüfung erfolgenden Aufzeichnung von Studiendaten und ihrer anonymisierten Weitergabe einverstanden bin.

Studien-Ergebnisse:

- ☐ Ich möchte das Ergebnis meiner Blutuntersuchung auf Viren erfahren.
☐ Ich interessiere mich für die wissenschaftlichen Ergebnisse der Studie (Publikation). Bitte stellen Sie mir nach Studienabschluss eine Publikationskopie zu (E-Mail-Angabe zwingend).

Persönliche Angaben:

Studien-Kode-Nummer (wird von der Studienleitung ausgefüllt):		
Name:		
Vorname:		
Geschlecht: <input type="checkbox"/> weiblich	<input type="checkbox"/> männlich	Geburtsdatum:
Anschrift:		
PLZ:		
Wohnort:		
E-Mail-Adresse:		

Datum/Unterschrift des Probanden

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 0364 1 93 00
 Internet: www.uniklinikum-jena.de
 Gerichtsstand Jena
 Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777
 Bankverbindung:
 Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Datum/Unterschrift des Arztes

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
 als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deufel
 Medizinischer Vorstand und Sprecher des Klinikumsvorstands:
 Prof. Dr. Klaus Höffken
 Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf
 Kaufmännischer Vorstand: Dr. Brunhilde Seidel-Kwem

9.6. Dokumentationsbogen



Prof. Dr. med. Mathias Pletz
 Zentrum für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene
 Universitätsklinikum Jena
 Erlanger Allee 101, 07747 Jena
 Tel.: 03641- 9324650
 E-Mail: mathias.pletz@med.uni-jena.de

Dokumentationsbogen

EBV-Studie

Studiennr.: _____

Studiengruppe:

- ☐ Erstinfektion
☐ Reaktivierung
☐ Asymptomatische Träger
☐ seronegativ

Probendatum: _____

Station: _____

Alter: _____

Geschlecht: ☐ weiblich ☐ männlich

EBV-Viruslast: ☐ negativ ☐ positiv mit _____ Kopien/ml

EBV-Serologie: **VCA** IgM ☐ positiv ☐ negativ ☐ unbekannt
 IgG ☐ positiv ☐ negativ ☐ unbekannt

EBNA1 IgM ☐ positiv ☐ negativ ☐ unbekannt
 IgG ☐ positiv ☐ negativ ☐ unbekannt

Aufnahmegrund/Diagnose:

Medikamentöse Therapie:

Sonstige Bemerkungen:

9.7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Syntheseweg und Translationskontrolle von miRNA und siRNA.	9
Abbildung 2: Lokalisation der EBV-miRNAs im Genom.	13
Abbildung 3: Ablaufschema der Probenanalyse.	31
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Probensammlung	35
Abbildung 5: Verteilung der allgemeinen Charakteristika über die einzelnen Studiengruppen.	37
Abbildung 6: Repräsentative Sensorgramme der qPCR-Läufe mit miR-BART5-5p-spezifischen Primern.	39
Abbildung 7: Vergleich der PCR-Ergebnisse für miR-BHRF1-1 mit eigenem und publiziertem Primerdesign.	39
Abbildung 8: qPCR-Ergebnisse für 2 virale miRNAs mit dem miScript-Assay.....	41
Abbildung 9: Analyse der qPCR-Spezifität mit miR-BART7-3p spezifischen RT-Primern.....	41
Abbildung 10: Einfluss der Loop-Primerkonzentrationen auf die Sensitivität der qPCR.	42
Abbildung 11: Einfluss der Präamplifikation auf die Sensitivität der qPCR.	43
Abbildung 12: Anzahl der positiv detektierten Proben für die einzelnen EBV-miRNAs.	44
Abbildung 13: Absolute Expression der viralen miRNAs im Vollblut.....	45
Abbildung 14: Expression im Vergleich zur humanen miR-16.....	45
Abbildung 15: Relative Expressionsunterschiede der einzelnen miRNAs.	46
Abbildung 16: Charakterisierung von Proben mit unbekannter Studiengruppe anhand des miRNA-Profiles.	49
Abbildung 17: Vergleich des zeitlichen Verlaufs einer Erstinfektion mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil in dieser Gruppe.	50
Abbildung 18: EBV-miRNA Expressionsprofile für zwei verschiedene lymphoproliferative Erkrankungen.	51
Abbildung 19: GAPDH-Expression nach Transfektion mit siRNA.....	52
Abbildung 20: AGAP-Expression nach siRNA-Transfektion.....	53
Abbildung 21: Zelluläre siRNA-Menge in Abhängigkeit von den Elektroporationsbedingungen.....	53
Abbildung 22: AGAP-Expression nach siRNA-Transfektion.....	54

Abbildung 23: Schematischer Ablauf der miRNA-Detektion mittels miScript-Assay..	57
Abbildung 24: Detektion des Loop-Primers in der Taqman-basierten PCR bei miR-BART7-3p.....	58
Abbildung 25: Effekt der Transfektion von verschiedener siRNA auf die GAPDH-Expression.....	83
Abbildung 26: Nachweis der EBV-Protease BVRF2-mRNA in transfezierten Zellen.	83

9.8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Zellen für die Transfektion.....	19
Tabelle 2: Auflistung aller Kits, die in der Arbeit verwendet wurden	19
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Fertigkits für die PCR	19
Tabelle 4: Verwendete Primer, synthetische miRNAs und Taqman-Sonden.	20
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Puffer	22
Tabelle 6: Weitere Materialien	23
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 8: Auflistung der Software.....	24
Tabelle 9: Vermehrungsfaktor der Moleküle durch die Präamplifikation.....	32
Tabelle 10: Zusammenfassung der durchgeführten Studie zu EBV-miRNA	34
Tabelle 11: Herkunft der Studienproben.....	36
Tabelle 12: Übersicht der eingeschlossenen und analysierten Studienproben	36
Tabelle 13: Vergleich der C _T -Werte von verschiedenen Isolationsmethoden für miRNA.	38
Tabelle 14: Korrelationskoeffizienten innerhalb der einzelnen Studiengruppen.	47
Tabelle 15: Übersicht der nicht zuordenbaren Patienten.....	48
Tabelle 16: Zusammenfassung aller Daten der EBV-Studie.	77

9.9. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Mathias Pletz und Frau Dr. Oliwia Makarewicz für das Vertrauen und Überlassen des hochinteressanten Themas. Sie haben mich während meiner Promotionszeit kompetent beraten und mir den Freiraum gegeben, eigene Ideen umzusetzen. Die professionelle Betreuung und vor allem die Hilfe bei der Organisation der Studie haben meine Arbeit maßgeblich vorangebracht.

Herrn Dr. Karim Kentouche danke ich für die Unterstützung bei der Probenakquirierung. Nur durch sein Engagement und seine Beharrlichkeit konnte die erforderliche Anzahl der Proben von Erstinfektionen gesammelt werden.

Des Weiteren bedanke ich mich beim Team der KMT Ambulanz, dem hämatologisch/onkologischen Labor der Kinderklinik, der Kinderchirurgie und allen weiteren Ärzten für die Unterstützung der Probensammlung.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Astrid Voigt für die Einführung in die Zellkulturmethoden und die stets motivierenden Worte.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Tobias Pöhlmann für das Design und Bereitstellen der siRNA, sowie die Hilfe bei den Transfektionsexperimenten und der Auswertung der Daten.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden sowie den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre. Sie haben mir immer Hilfe angeboten, mich motiviert und waren oft der erste Anlaufpunkt bei Problemfragestellungen.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern, die mir die Möglichkeit zum Studieren gaben, aber auch an meinen Mann, der mich stets unterstützt und motiviert hat.

9.10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Anita Hartung

Geburtsdatum: 27.08.1987
 Geburtsort: Arnstadt
 Geburtsname: Malkewitz
 E-Mail: anita.hartung@med.uni-jena.de

Akademische Ausbildung

07/2015 – 02/2016	Elternzeit
Seit 2013	Universitätsklinikum Jena Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Infektionsmedizin und Krankenhaushygiene
2006 - 2013	Friedrich-Schiller-Universität, Jena Studienfach: Biologie Hauptfach: Genetik Abschluss: Diplom (Note 1,3)
1998 - 2006	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Arnstadt Abschluss: Abitur (Note 2,0)

Poster

Hartung A, Makarewicz O, Pletz M (2018); EBV miRNA expression profiles of different infection stages: a prospective cohort study; ECCMID, Madrid

Hartung A, Makarewicz O, Pletz M (2017); Expression analysis of Epstein-Barr Virus miRNA in different stages of infection, EVBC, Jena

Machel AC, **Hartung A**, Gockel U, Makarewicz O (2017); Complement, Immunoglobulins and Sepsis, Sepsis Update, Weimar

Publikationen

- Hartung A**, Makarewicz O, Egerer R, Voigt A, Karrasch M, Sauerbrei A, Kentouche K, Pletz MW (2018); EBV miRNA expression profiles in different infection stages: a prospective cohort study; PLoS One
- Hagel S, Makarewicz O, **Hartung A**, Weiß D, Stein C, Brandt C, Schumacher U, Ehrlich R, Patchev V, Pletz MW (2019); ESBL colonization and acquisition in a hospital population: the molecular epidemiology and transmission of resistance genes; PLoS One
- Pletz MW, Wollny A, Dobermann U, Rödel J, Neubauer S, Stein C, Brandt C, **Hartung A**, Mellmann A, Trommer S, Edel B, Patchev V, Makarewicz O, Maschmann J (2018); A nosocomial foodborne outbreak of a VIM carbapenemase-expressing *Citrobacter freundii*; Clin Infect Dis
- Thieme L, Klinger-Strobel M, **Hartung A**, Stein C, Makarewicz O, Pletz MW (2018); *In vitro* synergism and anti-biofilm activity of ampicillin, gentamicin, ceftaroline and ceftriaxone against *Enterococcus faecalis*; J Antimicrob Chemother
- Forstner C, Kwetkat A, Makarewicz O, **Hartung A**, Pfister W, Fünfstück R, Hummers-Pradier E, Naber KG, Hagel S, Harrison N, Schumacher U, Pletz MW (2017); Nitroxoline in geriatric patients with lower urinary tract infection fails to achieve microbiologic eradication: a noncomparative, prospective observational study; Clin Microbiol Infect
- Malkewitz A**, Makarewicz O, Kentouche K, Keller P, Karrasch M, Pletz MW (2014); Epstein-Barr Virus MicroRNAs in plasma as potential biomarkers for chronic infections: (response to: Kawano et al; The Journal of Infectious Diseases; 2013; 208:771-9); J Infect Dis

9.11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. med. Mathias Pletz und Dr. rer. nat. Oliwia Makarewicz,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers